

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**REGULACION DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION
DEL COMPLEJO DE GOLGI POR FACTORES
CITOSOLICOS Y PROTEINAS G
HETEROTRIMERICAS**

TESIS DOCTORAL

MANUEL MUÑIZ GUINEA

Sevilla, 1996

TD -290

TD-349



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral REGULACION DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION DEL COMPLEJO DE GOLGI POR FACTORES CITOSOLICOS Y PROTEINAS O HETEROTRIMERICAS sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:

Manuel Huete Guemes

Sevilla, a 15 de Septiembre de 1996



R19822



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**REGULACION DE LA ESTRUCTURA Y FUNCION
DEL COMPLEJO DE GOLGI POR FACTORES
CITOSOLICOS Y PROTEINAS G
HETEROTRIMERICAS**

**Trabajo realizado en el Departamento de Biología Celular,
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para
optar al grado de Doctor en Biología por**

MANUEL MUÑOZ GUINEA

Sevilla, 1996

Dr. Angel Velasco

**Profesor titular de
Biología Celular
Universidad de Sevilla**

Directores:

Dra. Josefina Hidalgo

**Profesor titular de
Biología Celular
Universidad de Sevilla**

AGRADECIMIENTOS

Solía argumentar el ínclito filósofo español Francisco Sanchez, verdadero adelantado de su tiempo y precursor de Descartes, en su libro *Quod nihil scitur* (Nada se sabe), que todos los conocimientos aprendidos terminan siendo sustituidos por otros y que lo único que queda al final es la enseñanza del maestro, que deja su impronta en el discípulo y le indica el camino a seguir. Si el gran Aristóteles fue discípulo de Platón y este a su vez del reflexivo Sócrates yo no puedo olvidar mi orgullo y gratitud de haber sido discípulo de mis directores de tesis la Doctora Josefina Hidalgo y el Doctor Angel Velasco, a los cuales les debo un manifiesto agradecimiento por haberme formado no solo como científico sino también como persona.

Aunque no puedo mencionar a todos, sí me gustaría agradecer la ayuda y desinteresada colaboración prestada por todos los miembros del Departamento de Biología Celular, especialmente al Doctor Joaquín Piñero, quién siempre estuvo dispuesto para resolverme problemas y a Manuel Alonso con quien compartí muchas horas de laboratorio.

Tampoco sería justo no reconocer la ayuda prestada por personas de otros departamentos.



INDICE

INTRODUCCION.....	1
La ruta secretora.....	3
Los orgánulos secretores.....	4
Retículo endoplásmico.....	4
Compartimento intermedio.....	5
Complejo de Golgi.....	6
El mantenimiento de la identidad molecular de los orgánulos secretores.....	7
El mantenimiento de la organización estructural de los orgánulos secretores.....	8
El transporte exocítico está acoplado al transporte retrógado.....	8
Maquinaria molecular que sustenta el transporte vesicular.....	9
Proteínas de cubierta.....	10
Proteínas monoméricas de unión al GTP.....	10
Arf.....	11
Rab.....	12
Complejo proteico de fusión.....	13
v-SNARE y t-SNARE.....	13
SNAPs.....	14
NSF.....	14
Control del tráfico vesicular. Papel de las proteínas G heterotriméricas.....	15
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL Y METODOS.....	23
Cultivos celulares.....	23



Infección de las células con el mutante tsO45 del virus VSV.....	23
Marcaje metabólico.....	24
Permeabilización de las células con estreptolisina O.....	24
Preparación de proteínas citosólicas y fraccionamiento.....	25
Medio de ensayo y condiciones de incubación.....	26
Análisis de la proteína G del virus VSV.....	27
Inmunofluorescencia indirecta.....	28
Microscopía electrónica convencional.....	29
Inmunoperoxidasa.....	29
Tratamientos.....	31
RESULTADOS.....	34
Organización ultraestructural de las células NRK.....	34
Detección de los orgánulos secretores por inmunofluorescencia.....	36
El sistema de células permeabilizadas con estreptolisina O permite estudiar la regulación del transporte intracelular de proteínas.....	36
Un exceso de proteínas citosólicas induce la desorganización selectiva del complejo de Golgi.....	38
Curso temporal de la desorganización del Golgi.....	42
Los factores citosólicos promueven el transporte retrógrado desde el complejo de Golgi al retículo endoplásmico.....	44

La redistribución al retículo endoplásmico afecta a los diferentes compartimentos que componen el complejo de Golgi.....	50
Los factores citosólicos implicados en la desorganización del Golgi poseen naturaleza hidrofóbica.....	52
Requerimientos del transporte retrógrado inducido por factores citosólicos:.....	54
ATP.....	54
Temperatura.....	54
Microtúbulos.....	56
Inhibidores del transporte retrógrado inducido por factores citosólicos.....	57
GTP γ S.....	57
N-etilmaleimida (NEM).....	57
Curso temporal de las inhibiciones por GTPγS y NEM.....	58
El transporte retrógrado Golgi-retículo promovido por factores citosólicos está mediado por vesículas cubiertas.....	58
La acción de los factores citosólicos sobre las membranas de Golgi no cursa con la disociación de las proteínas de cubierta.....	59
Proteínas G heterotriméricas regulan el transporte retrógrado inducido por factores citosólicos.....	63
Diferentes tipos de proteínas G controlan el transporte retrógrado inducido por factores citosólicos.....	66
Gs.....	66
Gi.....	68
Efecto del AMPc sobre el transporte Golgi-retículo mediado por factores citosólicos.....	70

DISCUSION.....	75
Transporte retrógrado en células permeabilizadas con estreptolisina O.....	75
Diferencias con el efecto brefeldina A.....	76
Redes tubulovesiculares.....	78
Etapas en el transporte retrógrado Golgi-retículo inducido por factores citosólicos.....	79
Transporte retrógrado: ¿Vesículas ó túbulos?.....	79
Papel de los factores citosólicos en la potenciación del transporte retrógrado Golgi-retículo.....	82
Regulación del transporte retrógrado por proteínas G heterotriméricas y segundos mensajeros.....	83
CONCLUSIONES.....	89
BIBLIOGRAFIA.....	93

INTRODUCCION

Las células eucariotas están organizadas en una serie de compartimentos delimitados por membranas lipídicas. En cada compartimento se realizan actividades características, que son la expresión funcional de las moléculas residentes. Continuamente se llevan a cabo transferencias de metabolitos desde un compartimento a otro, de forma que, en un instante dado, unas moléculas determinadas ingresan en un compartimento, mientras otras parten de él con un destino prefijado. En muchos casos este transporte intracelular de pequeñas y grandes moléculas depende de vesículas de transporte, las cuales, de forma selectiva, transfieren materiales desde un compartimento donador a otro receptor.

La ruta secretora

La ruta secretora o exocítica constituye una de las principales vías de transporte intracelular [41]. En sentido estricto, se trata del camino que las proteínas de secreción recorren desde su lugar de síntesis hasta el espacio extracelular. Sin embargo, las proteínas de la membrana plasmática y aquellas que forman parte integral del retículo endoplásmico, Golgi, endosomas y lisosomas comparten también este trayecto o, al menos, parte del mismo [10].

Las proteínas son sintetizadas en los ribosomas asociados al retículo endoplásmico rugoso. En este orgánulo tiene lugar el

plegamiento y asociación de las cadenas polipeptídicas. También en el retículo se producen ciertas modificaciones covalentes como N-glicosilación, formación de puentes disulfuro y la incorporación de ácidos grasos. Posteriormente, son englobadas en vesículas y transportadas hasta el complejo de Golgi. A través de su recorrido por las sucesivas cisternas cis, medias y trans que componen el Golgi, las proteínas suelen ser ampliamente modificadas mediante la elaboración de estructuras carbohidratadas complejas, sulfatación y, en ciertos casos, escisión de propéptidos. Al final del Golgi, las proteínas son seleccionadas y enviadas hacia su lugar final de residencia, bien sea la membrana plasmática, el medio extracelular, los gránulos de secreción o los lisosomas. El transporte a través de las cisternas del Golgi y, desde éste, hacia esos otros destinos está igualmente mediado por vesículas [12].

Los orgánulos secretores

Retículo endoplásmico y complejo de Golgi constituyen, pues, las estaciones fundamentales del flujo exocítico. La organización morfofuncional de ambos orgánulos guarda relación con la posición que cada uno de ellos ocupa en la vía.

Retículo endoplásmico

Es un orgánulo único constituido por un conjunto de cisternas

membranas interconectadas. Forma una red o entramado membranoso extendido por todo el citoplasma. Aunque actualmente existe la tendencia a reconocer que consta de otros subcompartimentos adicionales [48], la idea tradicional era considerarlo subdividido en dos partes estructural y funcionalmente diferentes, aunque físicamente continuas entre sí. El retículo endoplásmico rugoso presenta una organización en sáculos, con ribosomas adosados a su superficie citosólica. Es el lugar de ingreso de las proteínas en la ruta exocítica. El retículo endoplásmico liso consta de una red de túbulos y está implicado en la biosíntesis de lípidos y en reacciones de detoxificación. Además, determinadas regiones del retículo, cuya configuración es en parte rugosa y en parte lisa, constituyen lugares de exportación de moléculas; es el llamado retículo de transición [41]. A este nivel, las proteínas son incluidas en vesículas de transporte para ser enviadas al complejo de Golgi.

Compartimento intermedio

En los últimos años se ha resaltado la existencia de acúmulos de vesículas y túbulos, con propiedades particulares, en un área citoplásmica comprendida entre el retículo endoplásmico y el Golgi. Tales estructuras parecen constituir el sitio preferente de evaginación de ciertos virus animales [53] y son normalmente lugares de tránsito de las proteínas durante su transporte desde el retículo al Golgi [25]. Asimismo, se han descrito proteínas marcadoras de estas membranas que, por hallarse prácticamente ausentes de otros orgánulos, tendrían la

consideración de residentes [15]. Se trataría, por tanto, de una estación adicional, con identidad propia, en la ruta secretora. Aunque se desconocen las actividades funcionales características del compartimento intermedio, se ha sugerido que podría constituir un lugar de verificación del estado de procesamiento y conformación de las proteínas [13]. Aquellas que superan tal control de calidad podrían seguir la vía de transporte hacia el complejo de Golgi, en tanto que las proteínas mal configuradas y los componentes endógenos del retículo retornarían a este último orgánulo.

Complejo de Golgi

El complejo de Golgi es centro de convergencia de las rutas exocítica y endocítica, y, por tanto, un orgánulo clave en el control del tráfico intracelular de proteínas y lípidos [33]. Estructuralmente se halla organizado en una serie de cisternas o sáculos apilados. En realidad, consta de varias pilas de sáculos o dictiosomas que, en las células animales, se hallan conectados lateralmente formando un entramado membranoso único, situado perinuclearmente y alrededor del centrosoma [33].

El Golgi es un orgánulo funcionalmente polarizado. Las proteínas procedentes del retículo endoplásmico ingresan en él a nivel de su cara cis o CGN (red cis del Golgi) y lo abandonan por su cara trans o TGN (red trans del Golgi). Entre ambos extremos se encuentran grupos de

cisternas (cis, medias y trans), que las proteínas atraviesan secuencialmente [10].

El mantenimiento de la identidad molecular de los orgánulos secretorios

Cada uno de los compartimentos de membrana que forman parte de la ruta secretora posee una dotación propia de moléculas residentes que lo caracterizan y diferencian de otras estructuras. A pesar del incesante flujo de moléculas que por ellos discurren, los orgánulos mantienen sus propiedades individuales. Para ello se utilizan dos mecanismos [38]. Por un lado, existen secuencias señalizadoras que, incorporadas a los componentes integrales de un determinado compartimento, los identifica y permite su retención específica. Por ejemplo, las proteínas endógenas del retículo endoplásmico poseen una secuencia característica de aminoácidos que las identifica como tales [43]. La estrategia es diferente para las proteínas integrales del complejo de Golgi. En este caso, las proteínas no presentan una secuencia de aminoácidos común, pero poseen segmentos transmembranas que se asocian entre sí formando complejos oligoméricos [37]. La retención de éstos en microdominios lipídicos de la membrana excluiría su incorporación en vesículas de transporte.

El mantenimiento de la organización estructural de los orgánulos secretores

En todo momento, la estructura de los orgánulos secretores es resultado de un equilibrio dinámico entre importación y exportación de componentes [19]. Si consideramos por ejemplo al complejo de Golgi, continuamente llegan hasta él vesículas procedentes del retículo endoplásmico conteniendo proteínas y lípidos de síntesis reciente. Desde el Golgi, a su vez, parten vesículas con moléculas destinadas a residir en otras localizaciones. Durante interfase el Golgi mantiene su organización de cisternas apiladas gracias a un balance aproximado entre ambas actividades. En mitosis el transporte retículo-Golgi se interrumpe y, consecuentemente, cesa la incorporación de membrana al Golgi. En estas condiciones, el orgánulo se desorganiza en vesículas [65]. Es, pues, crucial para la célula controlar los flujos de membranas en una y otra dirección, de forma que sea posible adecuarlos a las necesidades funcionales en cada momento.

El transporte exocítico está acoplado al transporte retrógrado

Los sistemas de retención de proteínas endógenas no evitan que, ocasionalmente, algunas de estas moléculas abandonen el orgánulo de residencia y, siguiendo el flujo general, alcancen otra localización [44]. Existe, sin embargo, la posibilidad de recuperar estas proteínas

escapadas y hacerlas retornar a su lugar de origen. Esta vía se conoce como transporte retrógrado y es esencial para el mantenimiento de la identidad de los orgánulos y la propia funcionalidad de la ruta secretora [25]. El caso mejor conocido es el de las proteínas solubles o lumenales del retículo endoplásmico. Las proteínas de esta clase tienen en su extremo carboxilo la secuencia de cuatro aminoácidos KDEL, que funciona como señal de retención [36]. Sin embargo, constantemente algunas de ellas son incorporadas en vesículas de transporte y logran viajar hasta el complejo de Golgi. Allí son reconocidas por un receptor específico para KDEL y, posteriormente, devueltas al retículo mediante transporte retrógrado [42]. A través de esta misma ruta se hacen retornar al retículo proteínas mal plegadas que, aunque no son componentes endógenos de este orgánulo, deben proseguir su procesamiento en el mismo [13]. En definitiva, el transporte retrógrado es cosustancial al transporte anterógrado a través de la ruta secretora.

Maquinaria molecular que sustenta el transporte vesicular

Todos los pasos de transporte en la vía exocítica están mediados por vesículas [41]. Son procesos complejos que comprenden varias etapas y en los que están implicadas diferentes tipos de moléculas. En términos generales puede esquematizarse el transporte en las siguientes fases: evaginación de una vesícula a partir de un compartimento donador, desplazamiento, reconocimiento de un compartimento receptor y fusión con él [50]. El uso de sofisticadas técnicas bioquímicas, como son los sistemas de transporte *in vitro*, y la obtención en levaduras de

mutantes de secreción, han permitido la identificación de muchas de las moléculas participantes. La mayoría son proteínas altamente conservadas entre eucariotas y, en conjunto, constituyen lo que se conoce como maquinaria de transporte.

Proteínas de cubierta

El transporte se inicia con la asociación a la membrana del compartimento donador de un conjunto de proteínas citosólicas para constituir una cubierta. Ello permite la deformación progresiva de la membrana, constituyéndose primero una protuberancia, que posteriormente se evagina como vesícula cubierta. Probablemente el transporte exocítico dependa de varios tipos de proteínas de cubierta, pero las mejor caracterizadas son aquellas conocidas como COP I [30]. Se trata de un complejo equimolecular de siete polipéptidos que media el transporte retículo-Golgi e intra-Golgi [66]. La cubierta es transitoria. Con anterioridad a su fusión con el compartimento receptor, la vesícula se desprende de sus proteínas de cubierta, las cuales vuelven a su forma citosólica [50].

Proteínas monoméricas de unión al GTP

El transporte vesicular depende de pequeñas proteínas (~21 Kda) de unión al GTP pertenecientes a la familia del oncogén ras [45]. Se trata de proteínas monoméricas que, en conjunto, regulan procesos

celulares muy variados. En principio son proteínas citosólicas aunque, tras experimentar una modificación post-traducciona l de tipo lipídico, se asocian reversiblemente a las membranas biológicas para llevar a cabo sus funciones . Presentan un dominio de unión a nucleótidos de guanina ocupado, alternativamente, por GTP ó GDP. La activación de estas proteínas consiste en el intercambio de GDP por GTP. Tras hidrolizar el GTP, las proteínas ras vuelven al estado inactivo de unión al GDP. Proteínas accesorias regulan el intercambio de GDP por GTP, así como la hidrólisis del GTP [58]. En lo que se refiere al transporte vesicular destacan dos clases de proteínas:

Arf

Arf es un tipo de proteína ras que presenta una cadena de ácido mirístico como modificación post-traducciona l [68]. En la célula, arf alterna entre un estado inactivo, en el que la proteína está unida a GDP y se encuentra en forma soluble ó citosólica, y otro activo, de unión a GTP y asociado a membrana. La activación de arf consiste, por tanto, en el intercambio de GDP por GTP, lo que ocasiona un cambio de conformación que posibilita su inserción en membranas a través del radical mirístico [54].

La unión de arf a una membrana particular trae consigo la incorporación a la misma de proteínas de cubierta procedentes del citosol [8]. A su vez, la asociación de las proteínas de cubierta origina la

formación de vesículas cubiertas. En otras palabras, arf es, en último término, la proteína que desencadena el proceso de evaginación [50].

En forma inversa, tras hidrolizar GTP, arf retorna a su estado soluble e inactivo. El desprendimiento de arf de la membrana de la vesícula da lugar a que las proteínas de cubierta también se disocien de ella. Se produce así la pérdida de la cubierta proteica, como requisito previo para que la vesícula pueda reconocer al compartimento receptor y fundir con el [61]

La importancia para el transporte vesicular del ciclo normal de activación e inactivación de arf queda puesta de manifiesto en los experimentos con GTP γ S. Este es un análogo no hidrolizable del GTP, capaz de incorporarse a las moléculas de arf en su sustitución. En presencia de un exceso de GTP γ S, arf permanece en un estado de activación permanente, por lo que la pérdida de la cubierta no tiene lugar y el transporte queda bloqueado a nivel de las vesículas cubiertas [31].

Rab

Al igual que arf, las proteínas rab son intrínsecamente hidrofílicas, aunque se asocian a las membranas mediante grupos isoprenoides. Están implicadas en el reconocimiento del compartimento

receptor por parte de la vesícula de transporte [46]. Dado que esta interacción entre membranas es específica, cada paso del transporte vesicular se halla regulado por una dotación particular de proteínas rab [39]. Los cambios cíclicos que experimentan son similares a los de las otras proteínas ras y están relacionados con las interconversiones, reguladas por otras proteínas, entre GDP y GTP.

Complejo proteico de fusión

Un complejo proteico constituido por proteínas solubles e integrales de membrana cataliza la fusión de la vesícula con el compartimento receptor [1]. Las proteínas participantes pertenecen a tres categorías:

v-SNAREs y t-SNAREs

Proteínas integrales de la membrana de la vesícula, denominadas genericamente como v-SNAREs, determinan el orgánulo con el cual ha de fundir. Por su parte, la membrana receptora presenta proteínas, conocidas como t-SNAREs, que interaccionan específicamente con las primeras. Este reconocimiento mutuo entre moléculas complementarias constituye la base molecular de la especificidad en las interacciones entre vesículas de transporte y compartimentos de membrana [55]. Las proteínas rab anteriormente comentadas modulan el reconocimiento entre SNAREs, determinando el anclaje final de la vesícula a su

membrana receptora [50].

SNAPs

Constituido el complejo entre v-SNARE y t-SNARE, se incorporan las proteínas citosólicas llamadas SNAPs [5]. Estas no son específicas de un paso de transporte particular, puesto que participan en múltiples interacciones entre membranas. Su función parece ser la de reclutar proteínas de fusión del tipo NSF.

NSF

Es una proteína citosólica con actividad ATPásica que cataliza la fusión entre membranas que, previamente, se han reconocido de forma específica y se encuentran, por tanto, muy próximas [55]. Por si mismo el factor NSF no posee afinidad por las membranas, pero se une rápidamente al complejo formado por v-SNARE/t-SNARE y SNAPs. Mediante un mecanismo no conocido, NSF utiliza la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP para inducir la fusión entre bicapas lipídicas [50]. De esta forma, la vesícula de transporte funde con su compartimento receptor, descargando en el su contenido. Tras ello, el complejo de fusión se desorganiza. NSF y SNAPs recuperan su condición de proteínas solubles y las v-SNAREs retornan al compartimento en el que estaban originalmente ubicadas.

Control del tráfico vesicular. Papel de las proteínas G heterotriméricas

Según una idea muy extendida, la maquinaria molecular que sustenta el transporte vesicular se encuentra sometida a regulación [28]. Tal control determinaría el número y tipo de las vesículas de transporte producidas a partir de un compartimento determinado, así como la cantidad y naturaleza de las moléculas transportadas. Asimismo, es probable que la célula regule las relaciones compensatorias entre diferentes rutas de transporte a fin de mantener la organización estructural de los orgánulos implicados. Los mecanismos de control y las moléculas reguladoras participantes son prácticamente desconocidos. Sin embargo, según estudios recientes, entre éstas últimas se encontrarían las proteínas G heterotriméricas. Se ha comprobado que existen formas intracelulares de proteínas G, cuya activación o inhibición repercute en la capacidad secretora de las células o en la velocidad de transporte desde un orgánulo particular a otro [4]. Así, por ejemplo, el transporte desde Golgi a superficie celular [47], la producción de gránulos de secreción [24] o el proceso de transocitosis [14] parecen estar regulados por proteínas G de diferentes tipos.

Las proteínas G triméricas son conocidas fundamentalmente por su participación en procesos de traducción de señales químicas a nivel de la membrana plasmática [11]. En esta localización, llevan a cabo el acoplamiento funcional de receptores de membrana activados con moléculas efectoras del tipo de enzimas o canales iónicos. En tal

sentido, los hallazgos sobre la participación de proteínas G en el control del tráfico intracelular abren la posibilidad de identificar rutas de señalización similares a nivel de las membranas limitantes de ciertos orgánulos.

OBJETIVOS

El objeto del presente estudio es analizar los requerimientos y propiedades de una modalidad de transporte retrógrado Golgi-retículo endoplásmico inducido por factores citosólicos, así como examinar la implicación en el proceso de factores reguladores del tipo de proteínas G heterotriméricas.

MATERIAL

Y

METODOS

Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas fueron: NRK (normal rat kidney), HeLa y COS. Las células fueron cultivadas en monocapa con medio Eagle modificado según Dulbecco (DMEM, Life Technologies, Renfrewshire, Reino Unido) conteniendo 10% de suero fetal de ternera, 20 mM de L-glutamina, 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera compuesta de 5% de CO₂ y 95% de aire. Cada dos días las células recibieron medio nuevo, siendo utilizadas para la realización de los experimentos al alcanzar el 90% de confluencia.

Infección de las células con el mutante tsO45 del virus VSV

Utilizamos un mutante termosensible (tsO45) del virus de la estomatitis vesicular (VSV). La propagación del virus se efectuó a 37°C en células COS. El medio de cultivo conteniendo viriones procedentes de células lisadas fue aclarado por centrifugación (8.000xg, 10 min) y titulado sobre monocapas de células NRK. Habitualmente, la suspensión contenía alrededor de 10⁹ pfu/ml. Las alícuotas de esta solución fueron almacenadas a -80°C.

Las monocapas de células NRK cultivadas en placas de 10 cm de diámetro fueron infectadas con 25 unidades formadoras de placa (pfu)

por célula. La adsorción del virus a la superficie celular se realizó durante 45 min a 32°C, con agitación suave, en 2 ml de medio DMEM sin suero, conteniendo 25 mM Hepes. 1.5 ml del medio de infección fueron reemplazados por 4.5 ml de medio completo con Hepes, continuando la incubación durante 2 h a 32°C.

Marcaje metabólico

Las células fueron incubadas a 39.5°C durante 15 min en medio con suero carente de metionina y cisteína, a fin de reducir los niveles intracelulares de estos dos aminoácidos. 100 µCi de Tran³⁵S-label (ICN Radiochemicals, Cleveland, EEUU) fueron añadidos a cada placa de cultivo de 10 cm de diámetro. Después de 3.5 min de marcaje radiactivo, las células fueron transferidas a hielo y lavadas con PBS frío conteniendo 1.5 mg/ml (un exceso de 100 veces) de metionina y cisteína no radiactivas. El medio de caza consistió en medio de ensayo (se describe posteriormente) conteniendo esta misma cantidad de ambos aminoácidos.

Permeabilización de las células con estreptolisina O

Se utilizaron células cultivadas sobre placas de cultivo o bien sobre cubreobjetos cubiertos con poli-D,L-lisina (Sigma Chem. Co., St. Louis, EEUU). Las monocapas fueron incubadas en hielo durante 5 min con 1 unidad/ml de estreptolisina O (Wellcome Diagnostics,

Beckenham, Reino Unido) disuelta en 20 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 110 mM KOAc, 2 mM Mg(AcO)₂, 1mM DTT. Tras lavar abundantemente con este mismo tampón frío, las células fueron incubadas a 37°C durante 5 min con 25 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 75 mM KOAc, 2.5 mM Mg(AcO)₂, 5 mM EGTA y 1.8 mM CaCl₂. La mayoría de las proteínas citosólicas fueron liberadas después de lavar varias veces las células permeabilizadas con este último tampón.

Preparación de proteínas citosólicas y fraccionamiento

El método de preparación fue el descrito por Taylor et al [62] con ligeras modificaciones. Todos los pasos se realizaron a 4°C. El cerebro bovino fue despojado de meninges e incubado toda la noche en 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM KCl, 250 mM sacarosa, 1mM DTT y 1mM PMSF. La homogenización tuvo lugar en 500 ml de este mismo tampón y se utilizó un Omni-mixer. El homogenado fue sometido a centrifugación (150.000xg durante 90 min) y el sobrenadante dializado exhaustivamente (18 h) contra varios cambios de 25 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 50 mM KAcO, 1 mM Mg(AcO)₂. La solución fue centrifugada a 10.000xg durante 30 min para eliminar precipitados y después concentrada hasta obtener 15-20 mg de proteína/ml. Alícuotas de esta preparación fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

El fraccionamiento de las proteínas citosólicas se efectuó por

cromatografía de interacción hidrofóbica. Las proteínas precipitadas con 30 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fueron dializadas contra 25 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 50 mM KAcO, 1 mM $\text{Mg}(\text{AcO})_2$ y aplicadas a una columna (14 ml de capacidad) de fenil-sefarosa CL-4B, previamente equilibrada con este mismo tampón conteniendo 10 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La elución se llevó a cabo con concentraciones crecientes (0, 30, 50, 70%) de etilenglicol en tampón. Las fracciones fueron dializadas contra 25 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 75 mM KOAc, 2.5 mM $\text{Mg}(\text{AcO})_2$, 5 mM EGTA y 1.8 mM CaCl_2 .

Medio de ensayo y condiciones de incubación

Las células permeabilizadas fueron incubadas en tampón de transporte (25 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 75 mM KOAc, 2.5 mM $\text{Mg}(\text{AcO})_2$, 5 mM EGTA y 1.8 mM CaCl_2) conteniendo citosol de cerebro bovino (0.1-10 mg de proteína/ml) y un sistema regenerador de ATP formado por: 1mM ATP, 5 mM creatina fosfato y 0.2 unidades de creatina fosfoquinasa (los tres productos de Sigma Chem. Co., St. Louis, EEUU). En los experimentos encaminados a analizar el procesamiento oligosacárido de la glicoproteína G del virus VSV, el medio de ensayo fué suplementado además con 1 mM UDP-GlcNAc y 2 mM UDP-Gal. Excepto cuando se especifica en forma distinta, las incubaciones se realizaron a 37°C durante el tiempo indicado en cada caso.

Análisis de la proteína G del virus VSV

Se utilizaron células infectadas que, previamente, fueron radiomarcadas, permeabilizadas e incubadas con medio de ensayo conteniendo proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP. Las células fueron transferidas a hielo, lavadas con PBS frío y lisadas con 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Tritón X-100, conteniendo inhibidores de proteasas (5 mM benzamidina, 1 mM PMSF, 100 µg/ml inhibidor de tripsina de soja). Los lisados fueron centrifugados en microfuga (3000xg, 5 min) y los sobrenadantes utilizados para inmunoprecipitar la glicoproteína G con el anticuerpo monoclonal P5D4, dirigido contra el extremo carboxilo terminal de la proteína [20]. La incubación se realizó durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente, se añadieron 400 µg/muestra de proteína G-Sefarosa CL-4B (Sigma Chem. Co., St. Louis, EEUU). Tras 1 h de incubación, los inmunoprecipitados fueron lavados varias veces con tampón de lisis y, después, desnaturalizados por ebullición en tampón acetato 100 mM (pH 5.6) conteniendo 0.2% SDS, 0.02 % Tritón X-100, 5 mM benzamidina y 1 mM PMSF. Las proteínas disociadas fueron digeridas a 37°C durante 16 h con 0.1 U/ml de endoglicosidasa H (endo H, Boehringer Mannheim, Alemania). Las muestras fueron después diluidas con tampón de electroforesis, reducidas con DTT y sometidas a ebullición, antes de ser analizadas mediante electroforesis monodimensional en geles de SDS-poliacrilamida. Se utilizaron geles con un contenido de acrilamida del 7.5 %, los cuales fueron analizados con los detectores de radiactividad Instantimager y FUJIX BAS 1000.

Inmunofluorescencia indirecta

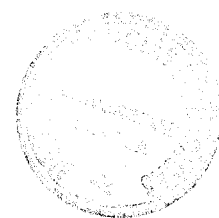
Se utilizaron monocapas adheridas a cubreobjetos. Las células fueron fijadas a temperatura ambiente durante 30 min con 4% de formaldehído (preparado a partir de paraformaldehído) en PBS, (pH 7.4). Después fueron lavadas secuencialmente con PBS y PBS conteniendo 0.5% albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Chem Co., EEUU), antes de ser permeabilizadas durante 10 min con 0.05% de saponina (Sigma) disuelta en PBS/0.5% BSA. Los distintos anticuerpos utilizados fueron diluidos en esta misma solución de PBS/BSA/saponina. Las incubaciones se realizaron en cámara húmeda, durante 30 min a 37°C, o bien durante 2 h a temperatura ambiente. Para la detección de β -COP, sin embargo, el antígeno hubo de ser parcialmente desnaturalizado con anterioridad a la incubación con el anticuerpo primario. En este caso, las células fijadas fueron permeabilizadas con 0.2% de Tritón X-100 y 0.5 % de SDS. Tras la incubación secuencial con anticuerpo(-s) primario(-s) y anticuerpo(-s) secundario(-s) marcado con fluoresceína o rodamina (TAGO, Burlingame, EEUU), las células fueron lavadas con PBS y montadas sobre portaobjetos, utilizándose 10% PBS/90% glicerol como medio de montaje. La observación de las muestras fue realizada en un fotomicroscopio Olympus AHB33 dotado con dispositivo de epifluorescencia.

Microscopía electrónica convencional

Las células, cultivadas en placas de 35 mm, fueron fijadas a temperatura ambiente durante 1 h en 2.5% glutaraldehído en tampón cacodilato sódico 100 mM (pH 7.4) conteniendo 0.1mM de CaCl_2 y 0.1 mM de MgCl_2 . Tras varios lavados con tampón cacodilato conteniendo 5% de sacarosa, fueron tratadas a 4°C durante 1 h con la mezcla 1% OsO_4 /1% $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ preparada en tampón cacodilato. Posteriormente, fueron lavadas con tampón e incubadas durante 30 min a 4°C con 1% de ácido tánico en cacodilato. Las células fueron lavadas con agua destilada, incubadas toda la noche con 1% de acetato de uranilo en agua, deshidratadas en soluciones de etanol de gradación creciente e incluidas en resina Epon 812. Las secciones finas fueron teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo y observadas en un microscopio Philips CM10.

Inmunoperoxidasa

Las células fueron fijadas durante 4 h a temperatura ambiente en el fijador conocido como PLP (2% paraformaldehído/75 mM lisina/10 mM NaIO_4 en tampón fosfato 37.5 mM, pH 6.2) [64]. Tras varios lavados con PBS, fueron permeabilizadas con 0.005 % de saponina en PBS conteniendo 0.5% BSA. La incubación con anticuerpo primario tuvo lugar durante toda la noche a 4°C en PBS/BSA/saponina. El anticuerpo secundario acoplado a HRP (TAGO, Burlingame, EEUU) fue también diluido en esta solución y las células estuvieron expuestas a él



durante 2 h a temperatura ambiente. Después fueron post fijadas con glutaraldehído al 4% en tampón cacodilato 100 mM (pH 7.4) conteniendo sacarosa al 2%. Tras varios lavados con tampón, la reacción fue revelada mediante incubación con una solución de 2 mg/ml de diaminobenzidina (Sigma Chem Co., EEUU) en 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, activada con 0.01% de H_2O_2 . Las células fueron tratadas con 1% OsO_4 /1% $K_4Fe(CN)_6$, deshidratadas e incluidas en Epon.

Tratamientos

Utilizamos los siguientes anticuerpos específicos:

Anticuerpo	Tipo	Antígeno	Referencia
Anti-Manosidasa II	Policlonal	Dominio luminal de la enzima de Golgi α -1,2-manosidasa II de rata	Velasco y cols, 1993
Anti-KDEL	Monoclonal	Secuencia KDEL de las proteínas lumbales del retículo endoplásmico	Tooze y cols, 1989
Anti-GalTf	Monoclonal	Galactosil transferasa humana, enzima de la cara trans del Golgi	Roth y Bergher, 1982
Anti-TGN 38	Policlonal	TGN 38 de rata, proteína integral de la red trans-Golgi	Luzio y cols, 1990
Anti-β-COP	Monoclonal	β -COP, proteína de cubierta de las vesículas de transporte	Duden y cols., 1991
Anti-Gαs	Policlonal	Subunidad α s de las proteínas G heterotriméricas Gs	Gilman, 1987
Anti-Gαi	Policlonal	Subunidad α i de las proteínas G heterotriméricas Gi	Gilman, 1987
Anti-proteína G	Monoclonal P5D4	Extremo C-terminal de la proteína G del virus VSV	Nakada y cols, 1991

Asimismo, utilizamos los compuestos:

Compuesto	Efecto	Dosis	Referencia
Nocodazol	Inhibe la polimerización de la tubulina	5 μ M	Turner y Tartakoff, 1989
GTPγS	Activa las proteínas G de forma permanente	100 μ M	Balch y cols., 1984
N-etilmaleimida (NEM)	Inhibe la fusión de las vesículas de transporte con los compartimentos receptores	1 μ M	Balch y cols., 1984
AlF₍₃₋₅₎	Activa a las proteínas G heterotriméricas	50mM de AlCl ₃ y 30 mM de NaF	Kahn, 1991
Subunidad $\beta\gamma$ de la transducina	Inactiva a las subunidades α libres al formar un complejo trimérico ($\alpha\beta\gamma$)	5 μ M	Bomsel y Mostov, 1992
Toxina del Cólera (TC)	Activa a las subunidades G α s	1mg/ml	Gilman, 1987
Toxina de Pertussis (TP)	Inhibe a las subunidades G α i	0.5 mg/ml	Gilman, 1987
Mastoparan	Estimula a las proteínas G heterotriméricas Gi /Go	0.5 μ M	Higashijima y cols., 1990
Adenosín monofosfato cíclico (AMPc)	Segundo mensajero que activa a las quinasas A	0.1 μ M	Gilman, 1987

RESULTADOS

Organización ultraestructural de las células NRK

Utilizamos células NRK (normal rat kidney) para estudiar la implicación de factores reguladores en el control del transporte intracelular de proteínas. Esta línea, procedente de células epiteliales del riñón de rata, está constituida por células poligonales que, en cultivo, crecen en monocapa.

Las células NRK tienen el núcleo en posición central, rodeado por orgánulos secretorios como el complejo de Golgi y el retículo endoplásmico (Fig. 1). El Golgi se localiza en posición perinuclear, junto al centrosoma. Está constituido por una serie de dictiosomas conectados entre sí, cada uno de los cuales consta de 4-6 cisternas apiladas, con numerosas vesículas asociadas. En este tipo celular el retículo endoplásmico es mayoritariamente rugoso, presentando zonas dilatadas de contenido electrón-lucido y cisternas delgadas de contenido denso. Los endosomas son numerosos y variados, existiendo tanto endosomas primarios como secundarios, cuerpos multivesiculares, etc. Las mitocondrias son abundantes, generalmente alargadas y con crestas longitudinales.

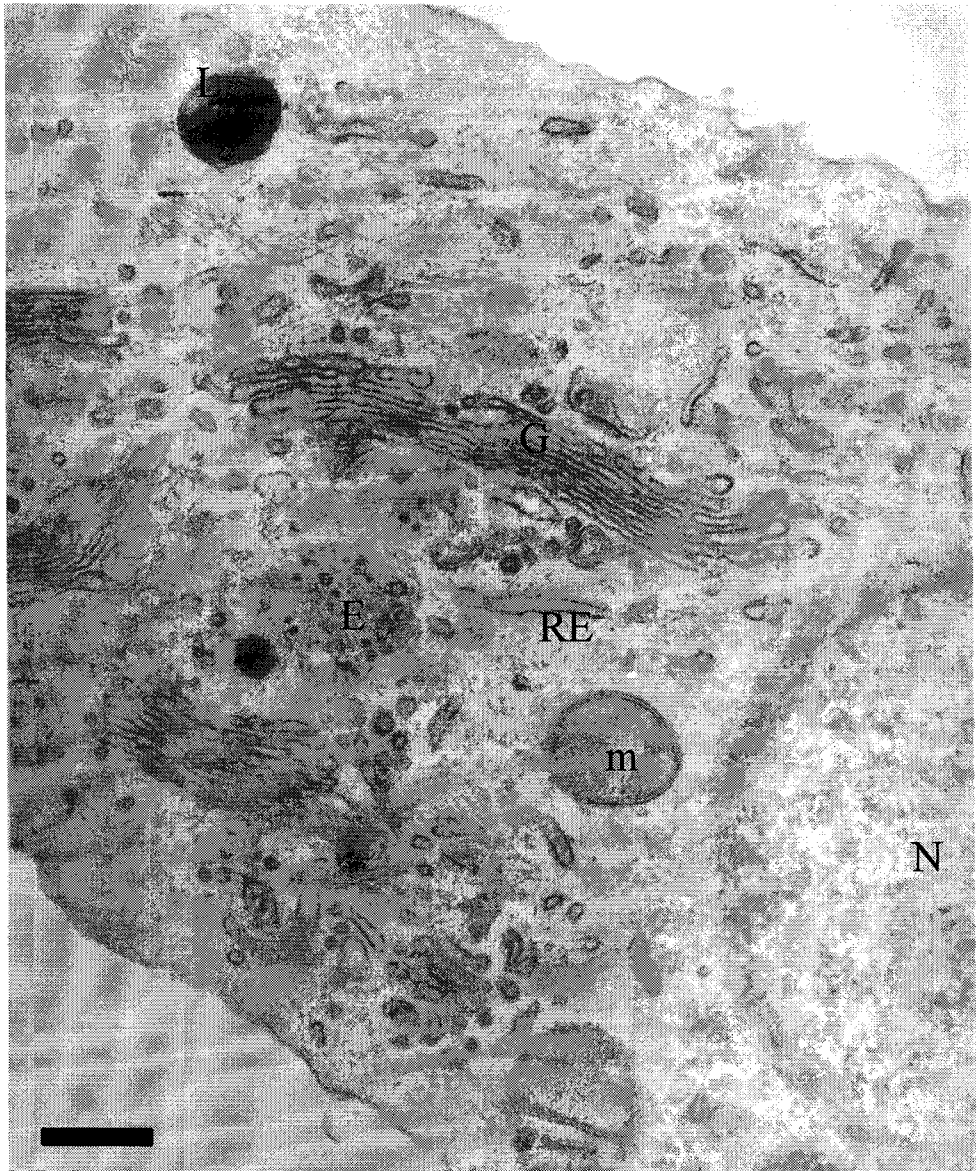


Fig. 1 : Características ultraestructurales de las células NRK. N: núcleo; G: complejo de Golgi; RE: retículo endoplásmico; E: endosoma; L: lisosoma; m: mitocondria. Barra, 0.25 μ m.

Detección de los orgánulos secretores por inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia indirecta permite estudiar la distribución topológica de los orgánulos secretores así como los cambios que estos puedan experimentar. En las células control, procesadas mediante esta técnica, el complejo de Golgi aparece constituido por una serie de membranas entrelazadas y serpenteantes, concentradas en la zona perinuclear (Fig. 2a). A menudo, la tinción fluorescente del Golgi ofrece una imagen característica de “media luna”. Por su parte, las cisternas del retículo aparecen como un fino entramado extendido por el citoplasma periférico (Fig. 2b).

El sistema de células permeabilizadas con estreptolisina O permite estudiar la regulación del transporte intracelular de proteínas

La estreptolisina O es una toxina bacteriana capaz de insertarse en las membranas biológicas y crear en ellas poros permanentes de un diámetro próximo a los 15 nm [3]. Con el fin de limitar la perforación a la membrana plasmática, tratamos células NRK con estreptolisina O a 4°C y, tras lavar el exceso de toxina no unida a la membrana, las incubamos a 37°C. A esta temperatura las moléculas de toxina, previamente incorporadas a la membrana, se asocian entre sí permitiendo la formación de poros.

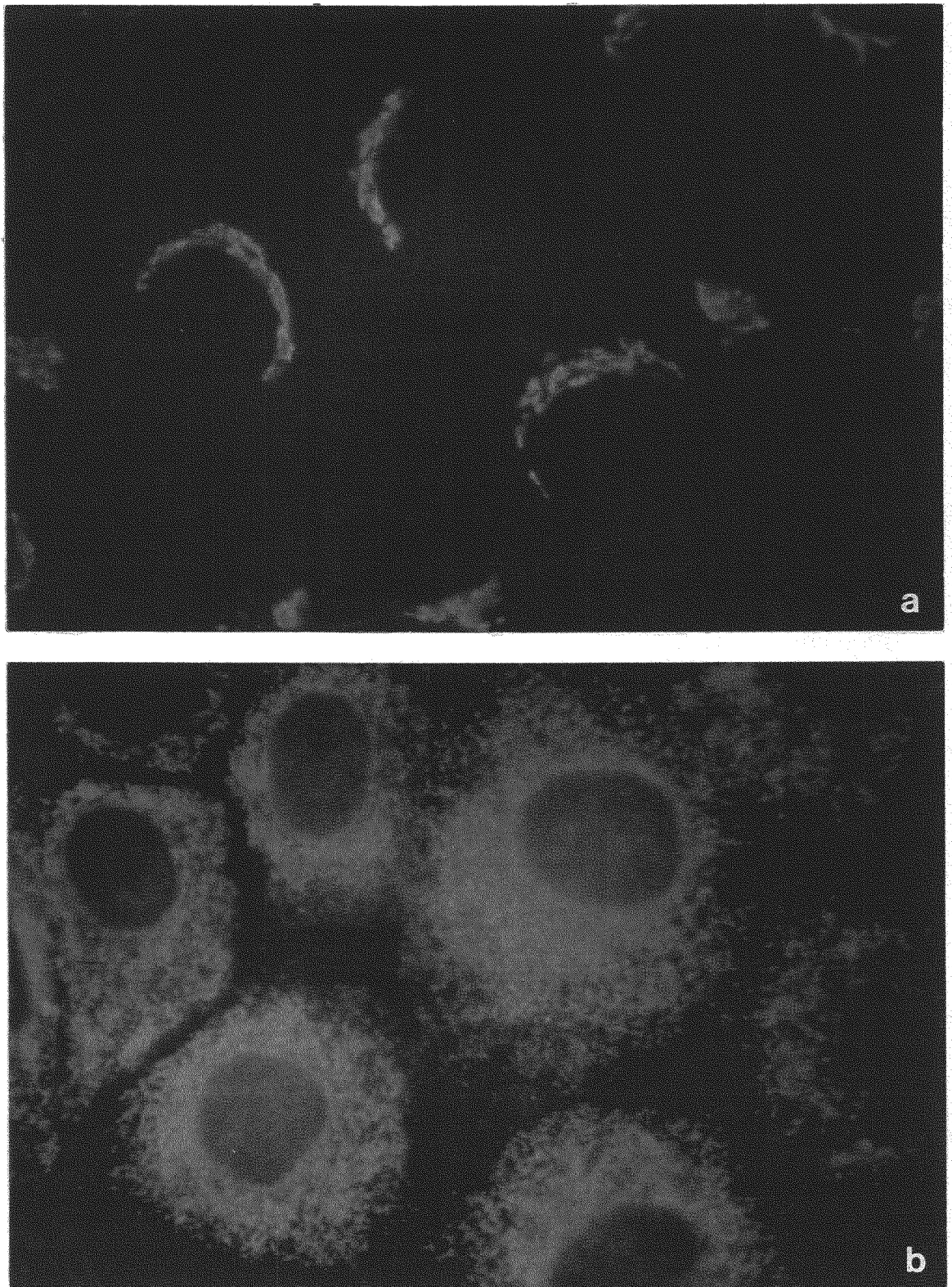


Fig. 2: Patrón de distribución de los orgánulos secretores analizado por inmunofluorescencia indirecta. **a:** Detección del complejo de Golgi con un anticuerpo dirigido contra α -manosidasa II, una enzima integral de este orgánulo. **b:** Detección del retículo endoplásmico con un anticuerpo dirigido contra la secuencia KDEL, presente en la mayoría de las proteínas luminales del retículo. Barra, 20 μ m.

Las células así permeabilizadas pierden la mayor parte de sus proteínas citosólicas; por ejemplo, más del 90% de la actividad láctico deshidrogenasa se libera al medio en estas condiciones. No obstante, los orgánulos secretores mantienen su organización estructural (Fig. 3). El complejo de Golgi conserva sus membranas apiladas y las cisternas del retículo endoplásmico rugoso conservan los ribosomas asociados. Las mitocondrias, sin embargo, muestran signos de alteración funcional.

Dado que en las células permeabilizadas con estreptolisina O el interior celular se hace accesible a moléculas foráneas de alto peso molecular, estudiamos la posibilidad de reproducir en este sistema los procesos de transporte entre orgánulos secretores que normalmente operan en células intactas. Así, al añadir proteínas citosólicas y un sistema regenerador de ATP conseguimos monitorizar el transporte de proteínas recién sintetizadas desde el retículo hasta el Golgi (Fig. 4). Por tanto, este resultado muestra la idoneidad del sistema de células permeabilizadas para el estudio de la maquinaria molecular que sustenta el tráfico entre orgánulos.

Un exceso de proteínas citosólicas induce la desorganización selectiva del Complejo de Golgi

Las células NRK permeabilizadas con estreptolisina O e incubadas a 37°C con una baja concentración de proteínas citosólicas (0.1-0.5 mg/ml) y sistema regenerador de ATP no mostraron cambios

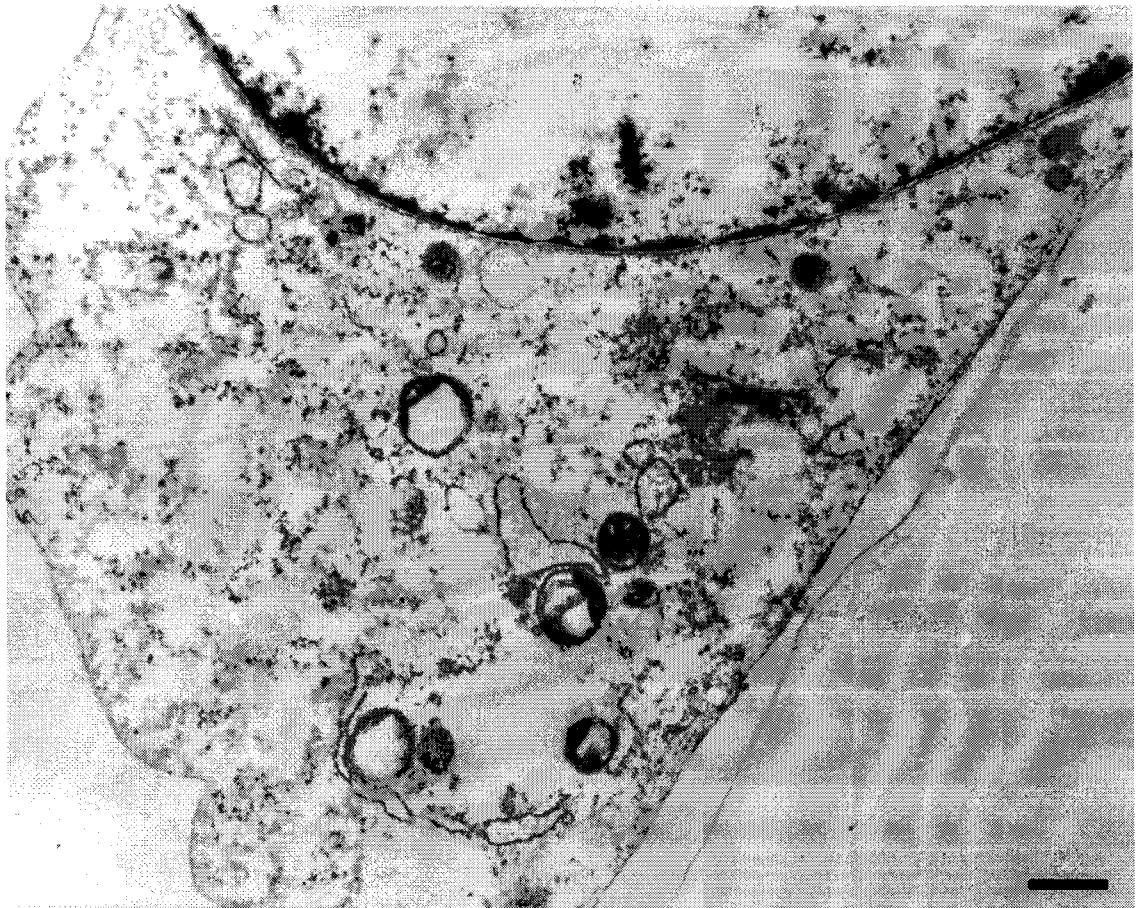


Fig. 3: Ultraestructura de las células permeabilizadas con estreptolisina O. N: núcleo; G: complejo de Golgi; RE: retículo endoplásmico; m: mitocondria. Barra, 0.25 μ m

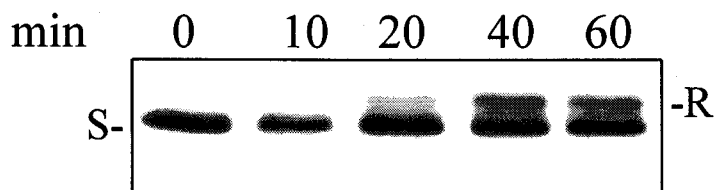


Fig. 4: Transporte desde el retículo endoplásmico al complejo de Golgi de la proteína G del virus VSV en células permeabilizadas con estreptolisina O. Células infectadas con el mutante termosensible tsO45 del VSV fueron marcadas radioactivamente con Trans³⁵S-label a temperatura restrictiva (39.5°C), permeabilizadas e incubadas a temperatura permisiva (32°C) con 100 μ g/ml de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP. A los tiempos indicados las células fueron lisadas, la proteína G inmunoprecipitada, tratada con endoglicosidasa H y analizada mediante electroforesis en SDS-PAGE. La aparición de 2 bandas con distinta movilidad durante el curso del tiempo pone de manifiesto el procesamiento de la proteína G desde una forma sensible (S) a otra resistente (R) a endoglicosidasa H y se corresponde con las modificaciones oligosacáridicas experimentadas en el complejo de Golgi.

estructurales en la organización del complejo de Golgi (Fig. 5). De hecho, tras 2 ó 3 h de incubación el orgánulo mantuvo una morfología similar a la descrita para células recién permeabilizadas (Fig. 3). Sin embargo, en las células perforadas expuestas durante 1 h a 37°C a una alta concentración de proteínas citosólicas (1-5 mg/ml) el complejo de Golgi experimentó importantes alteraciones estructurales. En lugar de la organización cisternal característica, se observaron redes membranosas tubulovesiculares en el área perinuclear de la célula (Fig. 6). Se trata de estructuras irregulares, muy ramificadas, próximas a cisternas del retículo endoplásmico y con algunas vesículas asociadas.

Al contrario que el Golgi, la envoltura nuclear y el retículo endoplásmico no mostraron modificaciones ultraestructurales significativas al incubar las células permeabilizadas con un exceso de proteínas citosólicas (Fig. 6). Tampoco tuvo lugar el proceso de desorganización del Golgi, cuando la preparación de proteínas citosólicas fue previamente desnaturalizada mediante calor o sustituida por una proteína irrelevante como albúmina de suero bovino. Así pues, se trata de un efecto selectivo sobre el Golgi provocado por determinados factores citosólicos.



Fig. 5: Ultraestructura del complejo de Golgi en células permeabilizadas con estreptolisina O e incubadas durante 1 h. a 37°C con baja concentración de proteínas citosólicas (0.1 mg/ml) y sistema regenerador de ATP. Barra, 0.2µm.

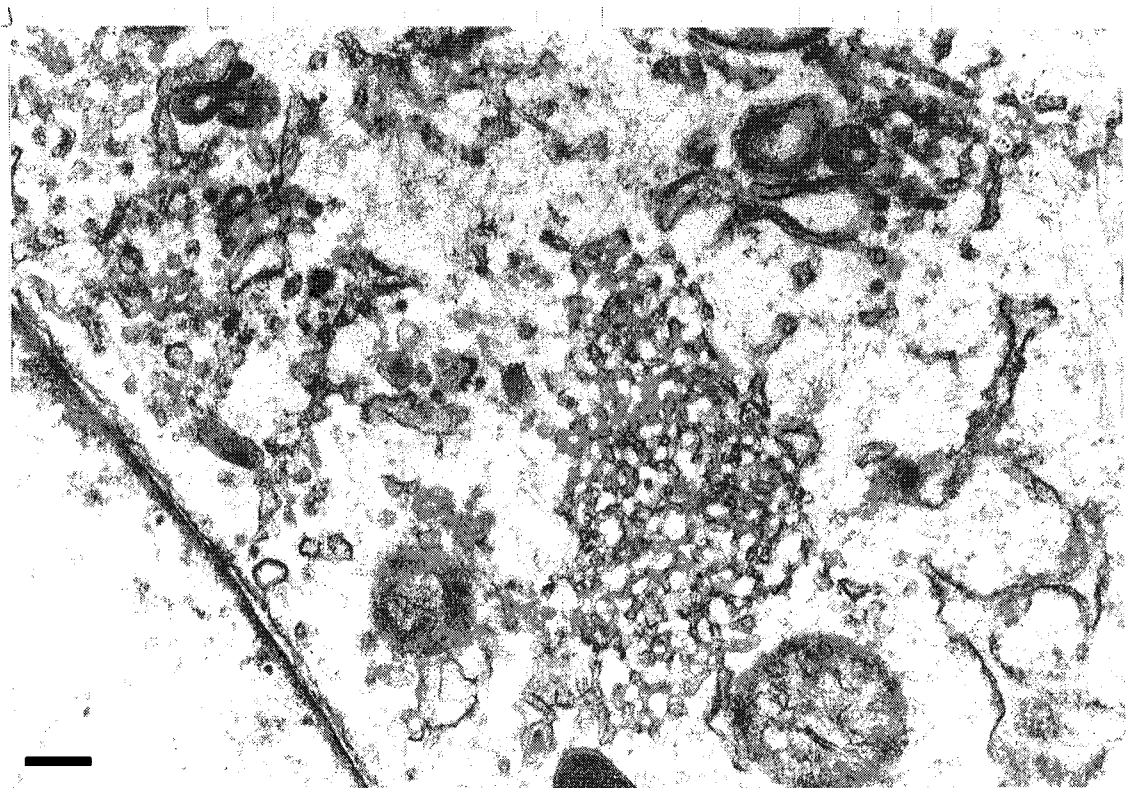


Fig. 6: Organización ultraestructural del area de Golgi en células permeabilizadas con estreptolisina O e incubadas durante 1 h. a 37°C con alta concentración de proteínas citosólicas (1.5 mg/ml) y sistema regenerador de ATP. Barra, 0.2 µm.

Curso temporal de la desorganización del Golgi

Estudiamos el curso temporal de la desorganización del Golgi inducida por factores citosólicos. Para ello, las células permeabilizadas con estreptolisina O fueron incubadas con una alta concentración de proteínas citosólicas, fijadas a distintos intervalos de tiempo y procesadas para inmunofluorescencia indirecta (Fig. 7). Como marcador de Golgi utilizamos un anticuerpo específico contra la enzima α -1,2-manosidasa II. Esta es una proteína integral del Golgi que, en el caso de las células NRK, se halla concentrada en las cisternas medias del orgánulo [64]. La desorganización del Golgi comenzó a los 10-15 min de incubación (Fig. 7a-b), derivando el patrón de localización perinuclear característico del orgánulo hacia un modelo más extendido y difuso. A los 40-60 min de exposición a alta concentración de factores citosólicos, la tinción para manosidasa II era totalmente reticular, ocupando todo el citoplasma (Fig. 7c). No obstante, con frecuencia se observaron, en la región perinuclear, restos de Golgi en forma de puntos o zonas circulares intensamente teñidas (Fig. 7d).

A nivel ultraestructural (Fig. 8) el proceso de desorganización pareció tener lugar a través de una progresiva vesicularización de las cisternas del Golgi. Así, durante los primeros momentos (5-20 min) del tratamiento con factores citosólicos, se observó disminución en el número de cisternas componentes del Golgi y, paralelamente, un aumento en el número de vesículas pequeñas (50-60nm) (Fig. 8a-b). Muchas de estas vesículas presentaban una cubierta proteica difusa en

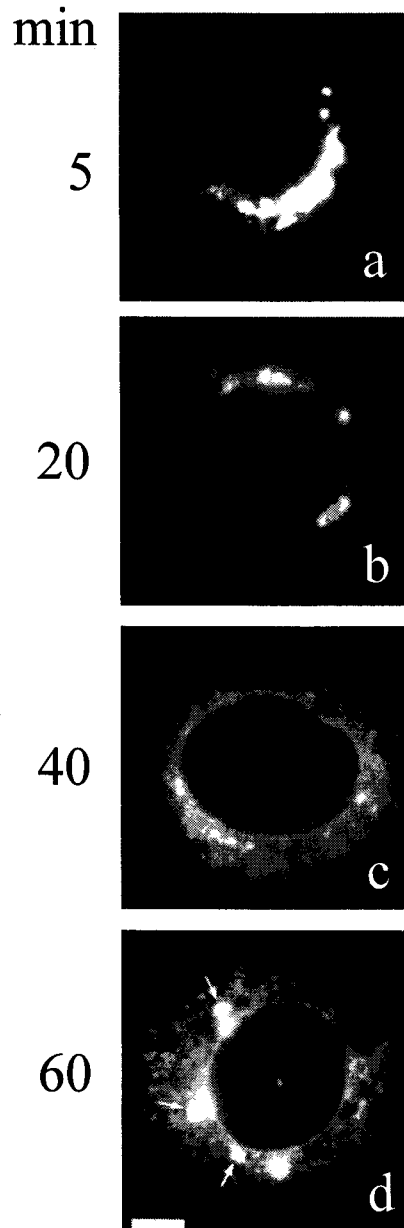


Fig. 7: Curso temporal de la desorganización del complejo de Golgi inducida por proteínas citosólicas. Las células fueron permeabilizadas e incubadas con una alta concentración (5 mg/ml) de proteínas citosólicas, fijadas a los tiempos indicados y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo contra α -manosidasa II. Las flechas indican restos de Golgi en localización perinuclear. Barra, 20 μ m.

su superficie citosólica (Fig. 8b, detalle). A tiempos de incubación mayores (40-60 min), lo más destacable fue la aparente dilatación experimentada por las cisternas del retículo endoplásmico, así como una disminución apreciable en el número de vesículas libres. Asimismo, las células incubadas durante un tiempo prolongado con alta concentración de factores citosólicos presentaron las estructuras tubulovesiculares antes mencionadas (Fig. 8c). Dada la proximidad de estas redes al núcleo celular, pensamos que se corresponderían con los remanentes de Golgi detectados por inmunofluorescencia (Fig. 7d).

Los factores citosólicos promueven el transporte retrógrado desde el complejo de Golgi al retículo endoplásmico

Los resultados anteriores muestran cómo la exposición de células permeabilizadas a una alta concentración de factores citosólicos da lugar a una desorganización selectiva del complejo de Golgi. Como consecuencia, el orgánulo, en lugar de la localización perinuclear característica (Fig. 2a), adopta una distribución difusa y extendida, parecida al patrón de tinción que habitualmente se obtiene con marcadores de retículo endoplásmico (comparese, por ejemplo, la Fig. 7d con la Fig. 2b). Tal redistribución sugirió la posibilidad de que los componentes del Golgi, una vez desorganizados bajo la influencia de los factores citosólicos, experimentasen fusión con el retículo endoplásmico. Con el fin de comprobar esta posibilidad, estudiamos mediante inmunofluorescencia la localización relativa de manosidasa II, utilizada como marcador de las membranas de Golgi, y de la secuencia

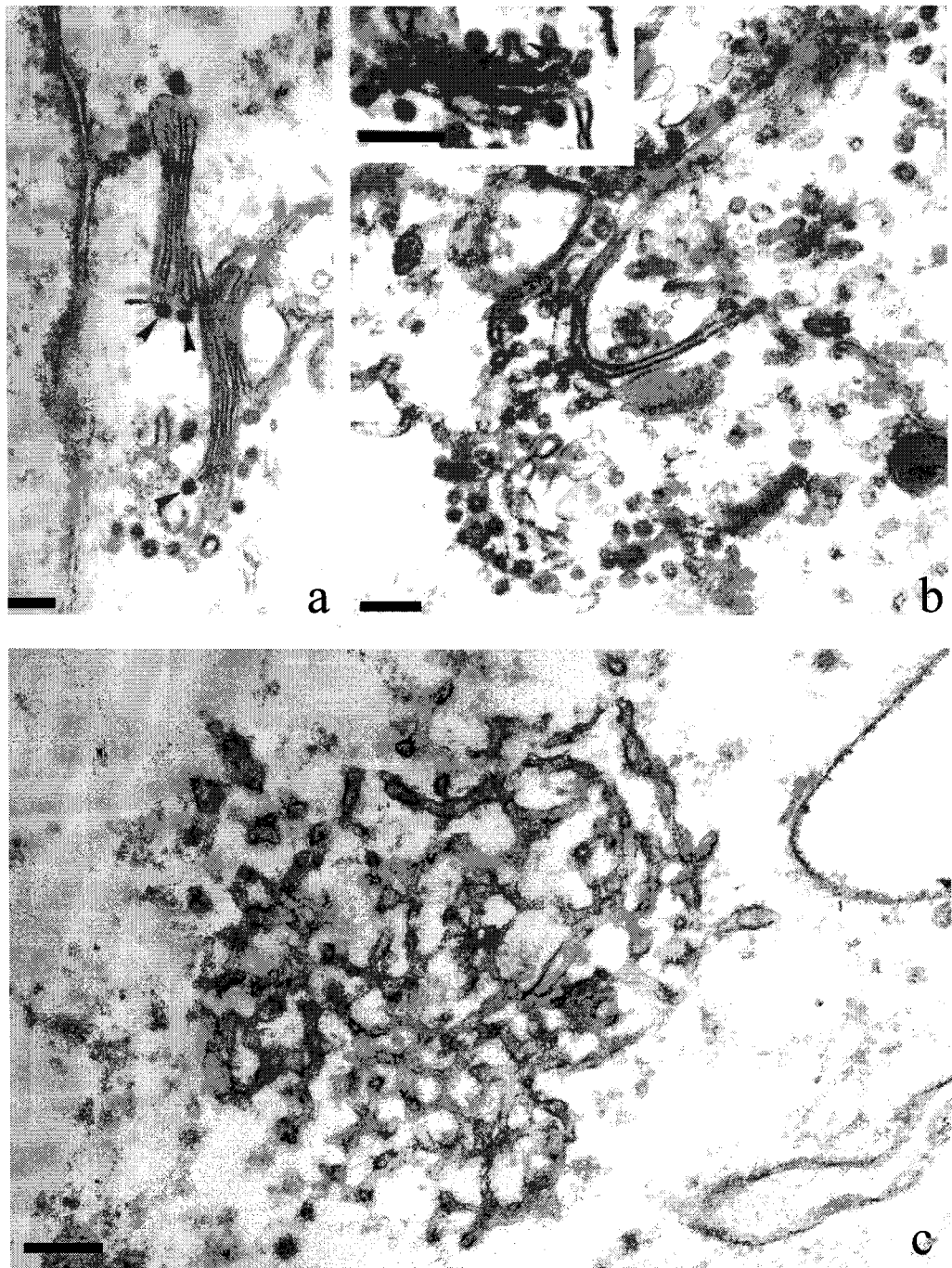


Fig. 8: Análisis ultraestructural de la desorganización del Golgi. Las células permeabilizadas fueron incubadas a 37°C con una alta concentración de proteínas citosólicas (1-5 mg/ml) y sistema regenerador de ATP durante 5 (a), 20 (b) o 60 (c) minutos antes de su fijación y procesamiento. Las flechas indican la presencia de vesículas cubiertas. Barra, 0.2µm.

carboxilo-terminal KDEL presente en proteínas residentes del retículo endoplásmico [42]. Como se muestra en la Fig. 9, una vez los factores citosólicos han ocasionado la redistribución completa del Golgi, se produce un solapamiento considerable entre las tinciones inmunofluorescentes para manosidasa II y secuencia KDEL. Aunque por si solo no concluyente, este resultado podría ser indicativo de la existencia de un transporte o flujo retrógrado desde Golgi hasta retículo endoplásmico. La confirmación definitiva vendría de la detección al microscopio electrónico de mannosidasa II por inmunoperoxidasa. La reacción se localizó en las cisternas del retículo endoplásmico, en la envoltura nuclear (Fig. 10) y, debilmente, en las redes tubulovesiculares antes comentadas. Así pues, los datos obtenidos apoyan la fusión de las membranas del Golgi, una vez desorganizadas, con las del retículo endoplásmico.

Dada la relevancia de una conclusión de este tipo, llevamos a cabo una aproximación experimental adicional que consistió en determinar la capacidad de las enzimas de Golgi relocalizadas en el retículo para procesar glicoproteínas en él retenidas. Para ello, analizamos el procesamiento de una glicoproteína integral de membrana, la proteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV), en células infectadas con un mutante (tsO45) termosensible de este virus. A la temperatura restrictiva (39.5°C) la proteína G recién sintetizada, debido a su estado mal plegado, permanece retenida en el retículo endoplásmico, en tanto que a temperatura permisiva (32°C) lo abandona y, tras recorrer toda la ruta

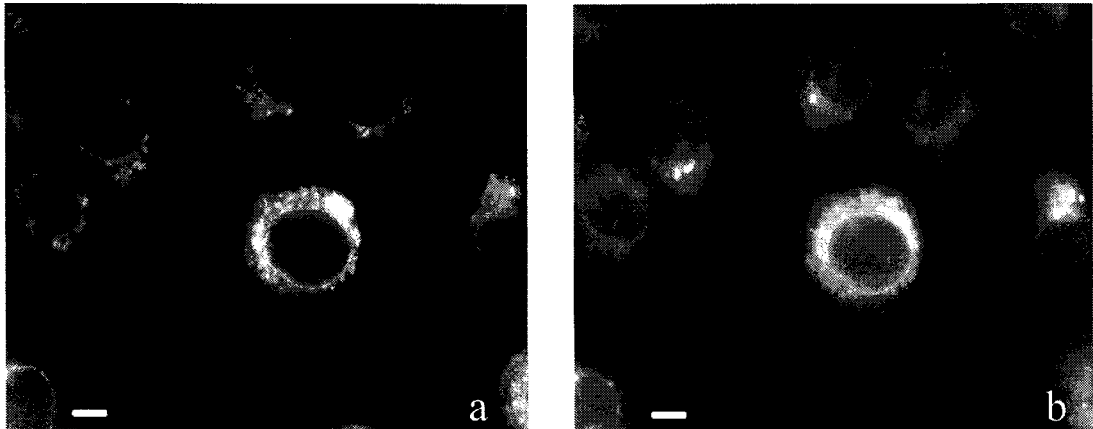


Fig. 9: Localización simultánea de marcadores de Golgi y retículo endoplásmico. Células permeabilizadas e incubadas con una alta concentración de proteínas citosólicas (5 mg/ml) y sistema regenerador de ATP durante 1 h. a 37°C. Tras la fijación, fueron teñidas para inmunofluorescencia con un anticuerpo policlonal contra α -manosidasa II (a), utilizado como marcador de las membranas de Golgi, y, al mismo tiempo, con un anticuerpo monoclonal contra la secuencia KDEL (b), marcador de las proteínas del retículo endoplásmico. Barra, 20 μ m.

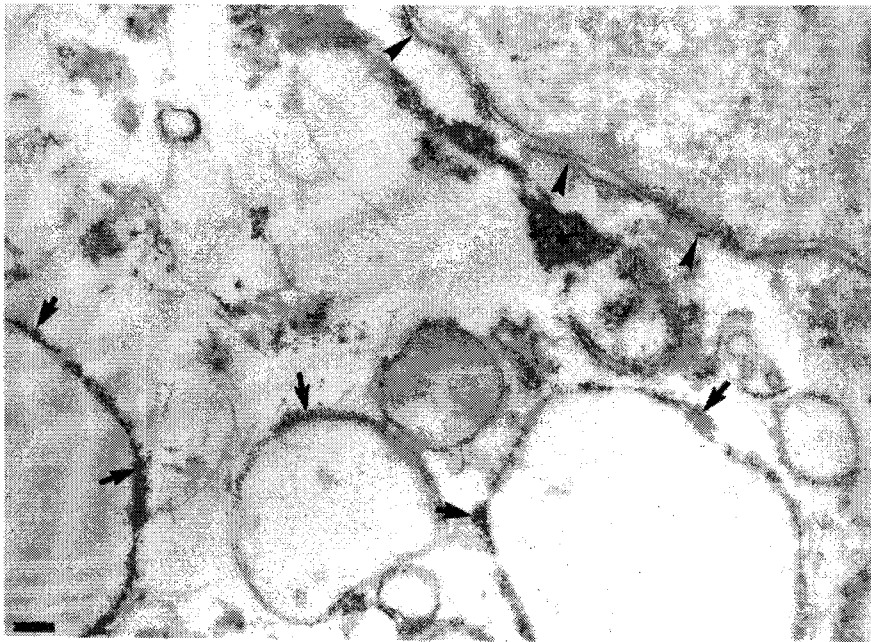


Fig.10: Detección por inmunoperoxidasa de α -manosidasa II. Las células permeabilizadas fueron incubadas durante 1 h. a 37°C con una alta concentración de proteínas citosólicas (5 mg/ml) y sistema regenerador de ATP. Después fueron fijadas y teñidas para la inmunoperoxidasa indirecta con anticuerpo anti- α -manosidasa II. Las membranas del retículo endoplásmico (flechas) y la envoltura nuclear (cabezas de flechas) aparecieron teñidas. El producto de reacción ocupó también el interior de algunas cisternas del retículo (asterisco). Barra, 0.2 μ m.

secretora, alcanza la membrana plasmática [2]. Las células infectadas fueron, por tanto, marcadas radioactivamente con Tran³⁵S-label a temperatura restrictiva, permeabilizadas con estreptolisina O e incubadas a esta misma temperatura con una alta concentración de proteínas citosólicas (Fig. 11). De esta forma, examinamos la posibilidad de que, como consecuencia de la redistribución del Golgi inducida por factores citosólicos, la proteína G del VSV, aún estando retenida en el retículo endoplásmico, adquiriese en sus oligosacáridos N-unidos modificaciones típicas de Golgi. La Fig. 12 muestra que aproximadamente 20-30% de la proteína G sintetizada durante el pulso radioactivo y retenida en el retículo fue procesada a una forma resistente a endoglicosidasa H. Ello indica que esta fracción de la proteína ha sido modificada por las enzimas de glicosilación que normalmente residen en el Golgi, constituyendo, pues, una prueba independiente más de la fusión de este orgánulo con el retículo endoplásmico. En cambio, cuando el ensayo se realizó con una baja concentración de proteínas citosólicas, la proteína G no experimentó procesamiento de sus oligosacáridos (Fig. 12), confirmando que, en estas condiciones, no tiene lugar redistribución del Golgi.

En definitiva, los resultados obtenidos indican que, cuando se hallan presentes a alta concentración, los factores citosólicos inducen la desorganización del complejo de Golgi, cuyas membranas terminan por fundir con el retículo endoplásmico, constituyéndose un orgánulo híbrido.

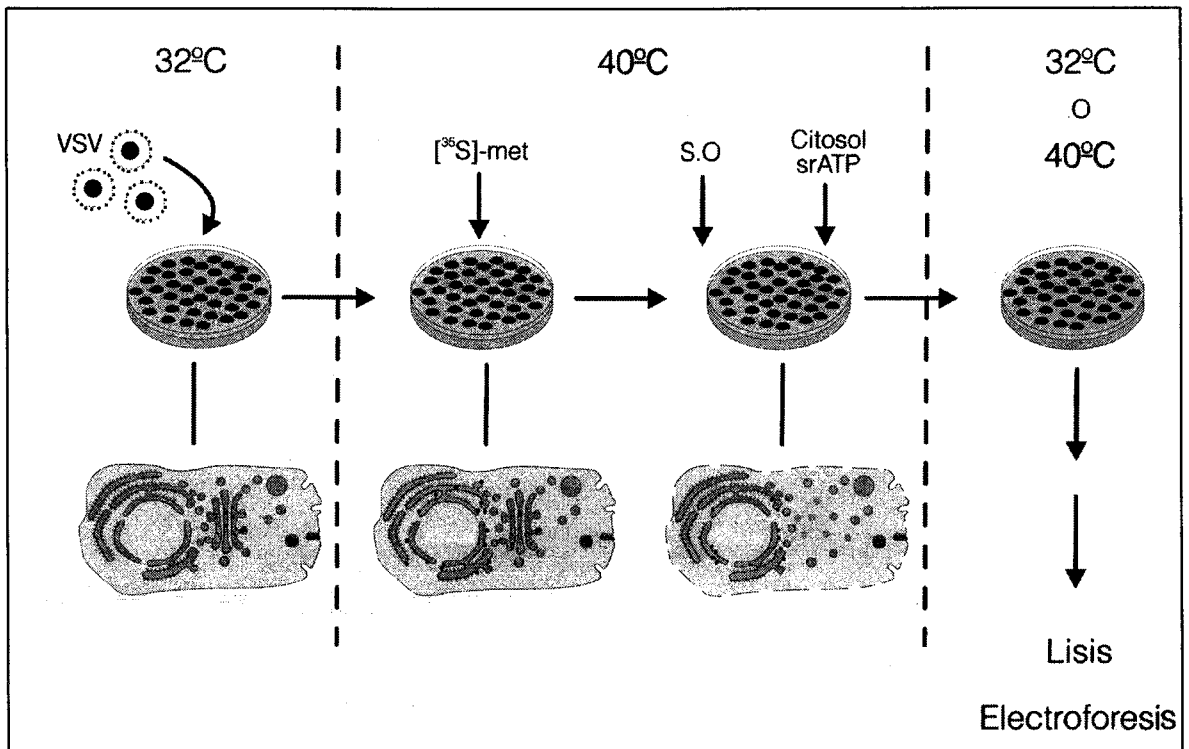


Fig. 11: esquema explicativo del experimento de la fig. 12.

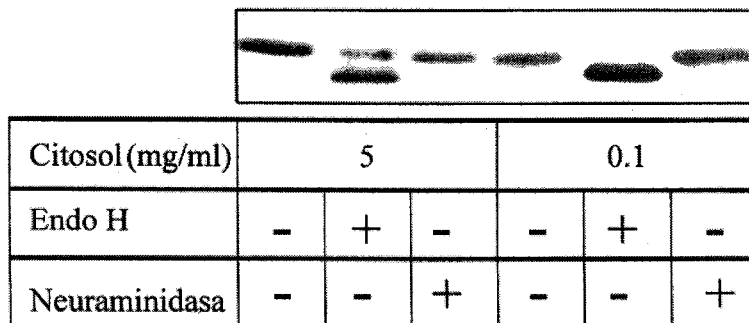


Fig. 12: Procesamiento de la glicoproteína G del virus VSV retenida en el retículo endoplásmico. Células infectadas con el mutante tsO45 del VSV fueron marcadas metabólicamente con $\text{trans}^{35}\text{S}$ -label a temperatura restrictiva (39.5°C), permeabilizadas e incubadas durante 1.5 h a esta misma temperatura en presencia de 5 mg/ml o 1 mg/ml de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP. La proteína G inmunoprecipitada fue sometida (+) o no (-) a digestión con endoglicosidasa H y neuraminidasa antes de ser procesada para electroforesis en SDS-PAGE.

La redistribución al retículo endoplásmico afecta a los diferentes compartimentos que componen el Complejo de Golgi

Habiendo estudiado la redistribución del marcador de las cisternas medias, manosidasa II, quisimos determinar si otros subcompartimentos del complejo de Golgi experimentaban también fusión con el retículo endoplásmico en presencia de factores citosólicos. Para ello, analizamos, mediante inmunofluorescencia indirecta, la localización de proteínas residentes de otras subregiones del Golgi (Fig. 13). Tanto la enzima galactosiltransferasa, presente en las cisternas trans [49], como la proteína integral de la red trans-Golgi denominada TGN 38 [29] experimentaron redistribución al incubar células permeabilizadas con un exceso de proteínas citosólicas. Sin embargo, la relocalización de estos marcadores ocurrió más lentamente que la de manosidasa II y, en ambos casos, no llegó a completarse totalmente. Incluso tras un tiempo prolongado de incubación con factores citosólicos, en la zona perinuclear permanecieron restos de Golgi conteniendo estas dos proteínas (comparese Fig. 13g con Figs. 13h-i). Así pues, aunque la desorganización del Golgi parece afectar a los distintos compartimentos que constituyen el orgánulo, no todos ellos redistribuyen de igual forma; los compartimentos proximales parecen fundir en mayor grado con el retículo endoplásmico que los distales.

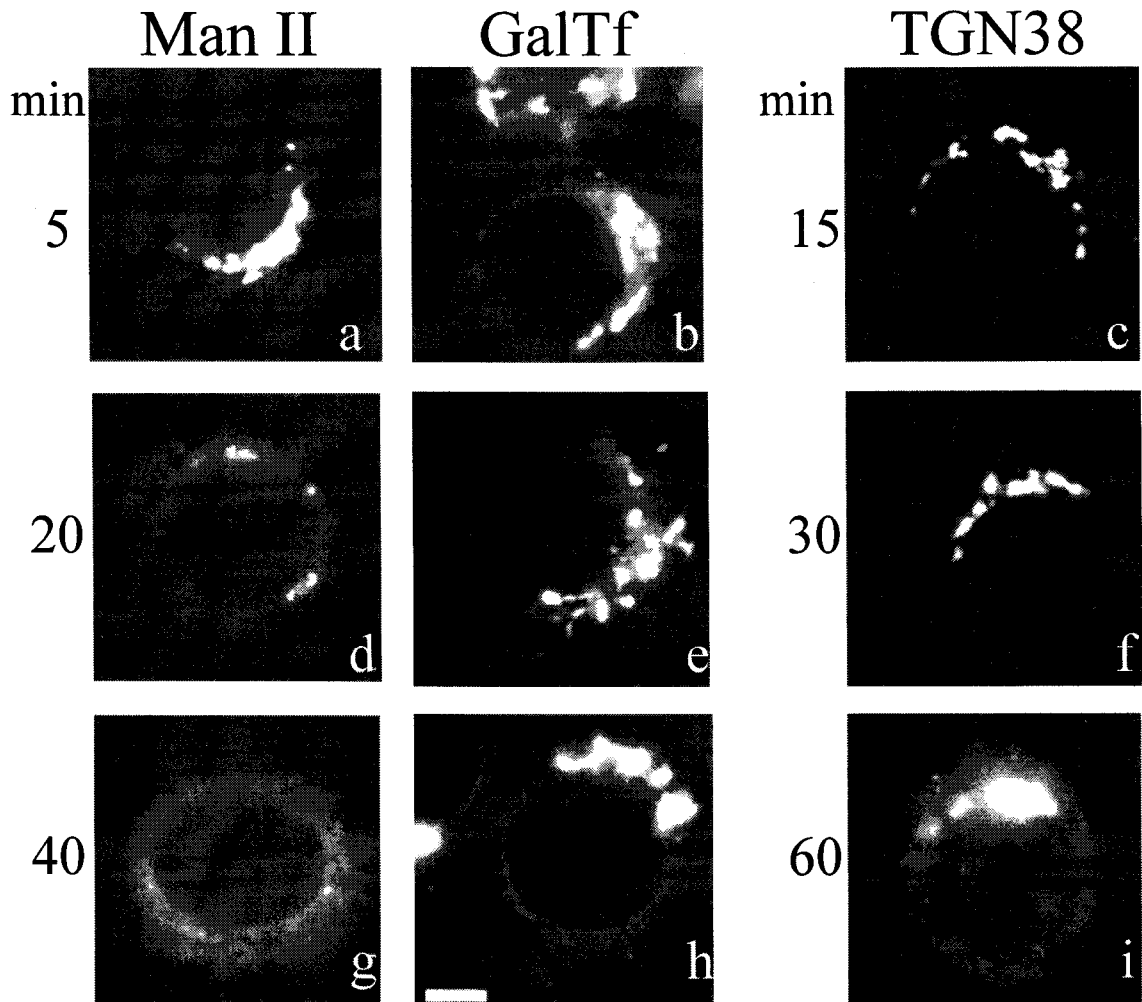


Fig. 13: Análisis comparativo de la redistribución de diferentes compartimentos del Golgi. Células NRK y Hela fueron permeabilizadas e incubadas a 37°C con una alta concentración de proteínas citosólicas (5 mg/ml) y sistema regenerador de ATP. A los tiempos indicados fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta. Las células NRK fueron teñidas con anticuerpo anti- α -manosidasa II (Man II) o bien con anticuerpo anti-TGN 38. Las células Hela lo fueron con anticuerpo contra galactosiltransferasa (GalTf). Barra, 20 μ m.

Los factores citosólicos implicados en la desorganización del Golgi poseen naturaleza hidrofóbica

Intentamos fraccionar la preparación cruda de citosol bovino utilizada en los estudios de redistribución del Golgi. En primer lugar, comprobamos que la mezcla de proteínas precipitadas con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contenía los factores necesarios para inducir el proceso de redistribución, en tanto que el resto de las proteínas, precipitadas posteriormente con 80% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fueron mayormente ineficaces a este respecto.

El siguiente paso consistió en la aplicación de la fracción activa a una columna de fenil-Sefarosa CL-4B. En este tipo de separación cromatográfica el fraccionamiento se realiza en base a la hidrofobicidad mostrada por las distintas proteínas. Las más hidrofóbicas son aquellas que, al exhibir mayor afinidad por la matriz, necesitan para su elución una alta concentración de un solvente orgánico del tipo de etilenglicol. Analizamos, por tanto, la capacidad para inducir la redistribución del Golgi de las distintas fracciones proteicas desplazadas de la matriz de fenil-Sefarosa al eluir con concentraciones crecientes de etilenglicol (Fig. 14). Las proteínas mas eficaces fueron las extraidas con una solución de etilenglicol al 50%, lo que indica que los factores citosólicos responsables de la redistribución del Golgi tienen carácter netamente hidrofóbico. Además, ello sugiere que podría tratarse de proteínas que, aún siendo citosólicas, tuviesen capacidad para asociarse a las

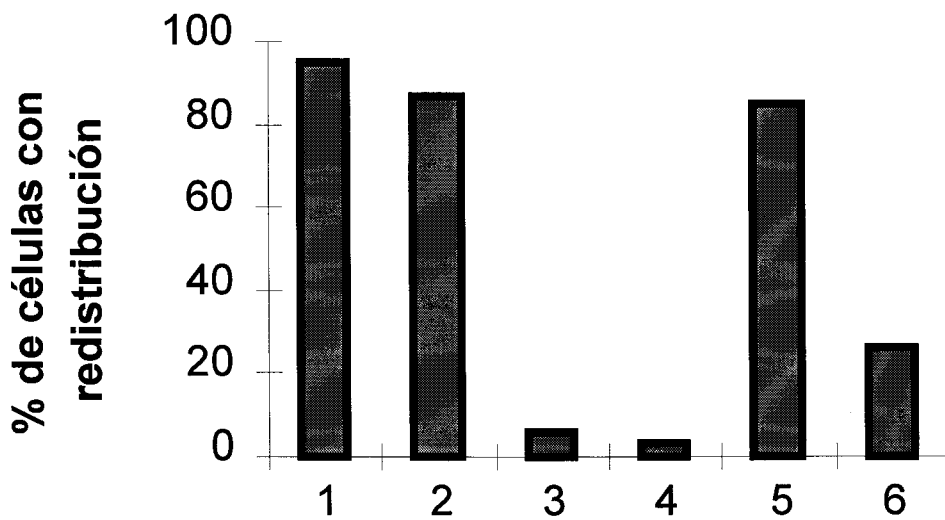


Fig. 14: Fraccionamiento de los factores citosólicos. Las células permeabilizadas fueron incubadas a 37°C durante 1h con sistema regenerador de ATP y 5 mg/ml de: (1) citosol de cerebro bovino sin fraccionar; (2) proteínas citosólicas precipitadas con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y las distintas frcciones recogidas tras la aplicación de proteínas citosólicas precipitadas con 30% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una matriz de fenil-sefarosa CL-4B y eluidas con tampón de diálisis conteniendo 10% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0 (3), 30% (4), 50% (5) y 75% (6) de etilenglicol.

membranas de Golgi, tal y como lo hacen algunas de las moléculas responsables del transporte vesicular entre compartimentos [51].

Requerimientos del transporte retrógrado inducido por factores citosólicos

ATP:

El proceso de redistribución del Golgi al retículo endoplásmico dependió de la presencia de una fuente de energía química en el medio de ensayo. Para ello, incorporamos un cocktail regenerador de ATP formado por: creatina fosfato, creatín fosfoquinasa y el mismo ATP. La omisión de ATP impidió la acción de los factores citosólicos sobre el Golgi (Fig. 15a), evidenciándose así la naturaleza activa del fenómeno.

Temperatura:

El transporte retrógrado Golgi-retículo promovido por factores citosólicos fue también estrictamente dependiente de temperatura fisiológica. En incubaciones realizadas a baja temperatura, tanto a 15°C (Fig.15c) como a 20°C (Fig. 15d), el complejo de Golgi, aunque parcialmente fragmentado a juzgar por el patrón fluorescente de manosidasa II, conservó su identidad como orgánulo, no fundiendo con el retículo endoplásmico.

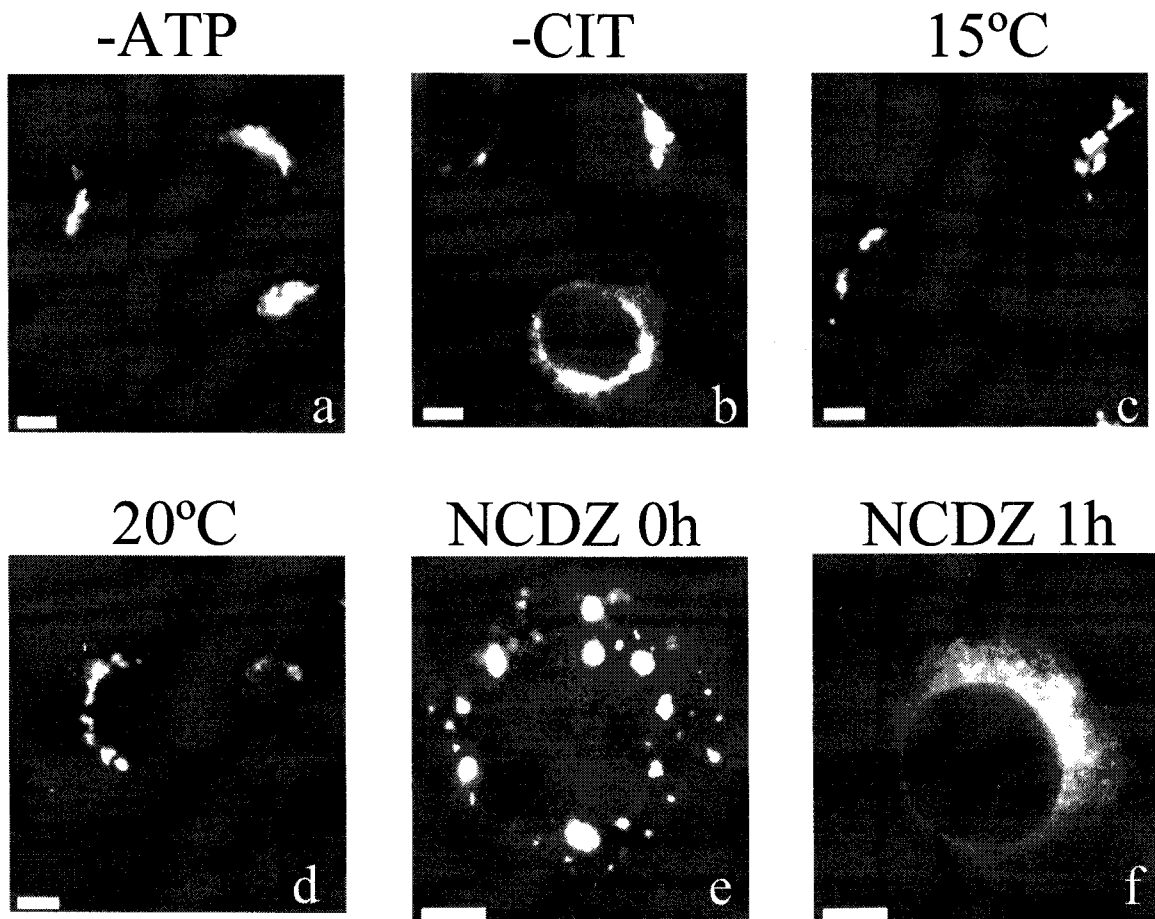


Fig. 15: Requerimientos del proceso de redistribución del Golgi inducido por factores citosólicos. a-d: las células fueron permeabilizadas e incubadas durante 1 h. en el medio descrito en la fig. 13. Los efectos resultantes de omitir ATP (-ATP, a) o citosol (-CIT, b) del medio de ensayo fueron examinados, así como aquellos derivados de la incubación en medio de ensayo completo a temperatura no fisiológica, 15°C (c) o 20°C (d). e-f: Las células fueron inicialmente tratadas con 5 μ M de nocodazol (NCDZ) durante 1 h. a 37°C y después permeabilizadas; posteriormente, fueron incubadas con una alta concentración (5 mg/ml) de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP a 37°C en presencia continua de nocodazol durante 0 min (e) ó 1 h. (f). En todos los casos la tinción inmunofluorescente se corresponde con la detección de α -manosidasa II. Barra, 20 μ m.

Microtúbulos:

Durante interfase la disposición perinuclear del complejo de Golgi requiere una red intacta de microtúbulos. Cuando las células son incubadas con un agente que, como el nocodazol, desorganiza los microtúbulos, el complejo de Golgi experimenta fragmentación en dictiosomas individuales, los cuales quedan dispersos por el citoplasma [63]. En estas condiciones, el modelo de tinción inmunofluorescente para manosidasa II es el de una serie de puntos brillantes distribuidos al azar (Fig. 15e). Con el fin de determinar la necesidad o no de microtúbulos para el transporte retrógrado, permeabilizamos células, previamente tratadas con nocodazol, y las incubamos con un exceso de proteínas citosólicas. Nocodazol fue incluido en el medio de ensayo para prevenir una posible reorganización de los microtúbulos. De hecho, la inmunotinción con anticuerpo anti-tubulina mostró que los microtúbulos permanecieron despolimerizados. En estas condiciones, los factores citosólicos promovieron la redistribución de manosidasa II (Fig. 15f). Este resultado, por tanto, indica que los microtúbulos intactos no constituyen un requerimiento para el transporte retrógrado Golgi-retículo inducido por factores citosólicos. Es más, estos factores pueden actuar tanto sobre el Golgi intacto típico de las células control, como sobre el orgánulo fragmentado tras el tratamiento con nocodazol.

Inhibidores del transporte retrógrado inducido por factores citosólicos

GTP γ S:

GTP γ S es un análogo no hidrolizable del GTP. Al igual que éste último, GTP γ S se une a las proteínas G (de unión a GTP) activándolas, en este caso, de forma permanente. Por tanto, el tratamiento con GTP γ S pone de manifiesto la implicación, en un determinado proceso, de proteínas G tanto heterotriméricas como monoméricas [4]. Tras añadir GTP γ S al medio de ensayo conteniendo células permeabilizadas y proteínas citosólicas la redistribución del complejo de Golgi no tuvo lugar (Fig. 16b). Esta inhibición refleja, pues, la participación de proteínas G en la regulación del proceso de redistribución del Golgi bajo la influencia de factores citosólicos.

N-etilmaleimida (NEM):

NEM es un agente alquilante con múltiples acciones celulares. Entre las moléculas modificadas por NEM se encuentra NSF (NEM sensitive protein), una de las diferentes proteínas de fusión que participan en el transporte vesicular entre orgánulos [50]. En particular, NSF es reconocido como un factor general de fusión, ya que está implicado en numerosos pasos de transporte de las vías exocítica y endocítica [57]. NEM fue un inhibidor eficaz del transporte retrógrado Golgi-retículo inducido por factores citosólicos (Fig. 16c), un proceso que podría, por tanto, estar mediado por NSF.

Curso temporal de las inhibiciones por GTP γ S y NEM

Determinamos el momento de actuación de los agentes inhibidores anteriores en la ruta Golgi-retículo activada por factores citosólicos. Incubamos las células permeabilizadas con una alta concentración de proteínas citosólicas y, a distintos tiempos, añadimos uno de los inhibidores, GTP γ S o bien NEM, continuando la incubación en presencia del agente en cuestión hasta completar 1 h de tratamiento (Fig. 17). En base a la localización de manosidasa II por inmunofluorescencia, dedujimos que la inhibición por GTP γ S únicamente tenía lugar si éste compuesto se hallaba presente al comienzo de la incubación (Fig. 17a). Añadido al medio de ensayo después de 7-10 min de iniciarse el proceso, GTP γ S fue incapaz de inhibir la redistribución del Golgi (Fig. 17b-d). Por el contrario, NEM continuó siendo efectivo como inhibidor durante los primeros 20 min de incubación (Fig. 17e-g). A partir de entonces el proceso fue insensible a este agente (Fig. 17h). Así pues, de acuerdo con estos resultados cada inhibidor afectaría un paso diferente del transporte Golgi-retículo.

El transporte retrógrado Golgi-retículo promovido por factores citosólicos está mediado por vesículas cubiertas

Con el fin de identificar estructuras intermediarias en la vía de desorganización del Golgi mediada por factores citosólicos llevamos a cabo el examen ultraestructural de las células tratadas con GTP γ S.

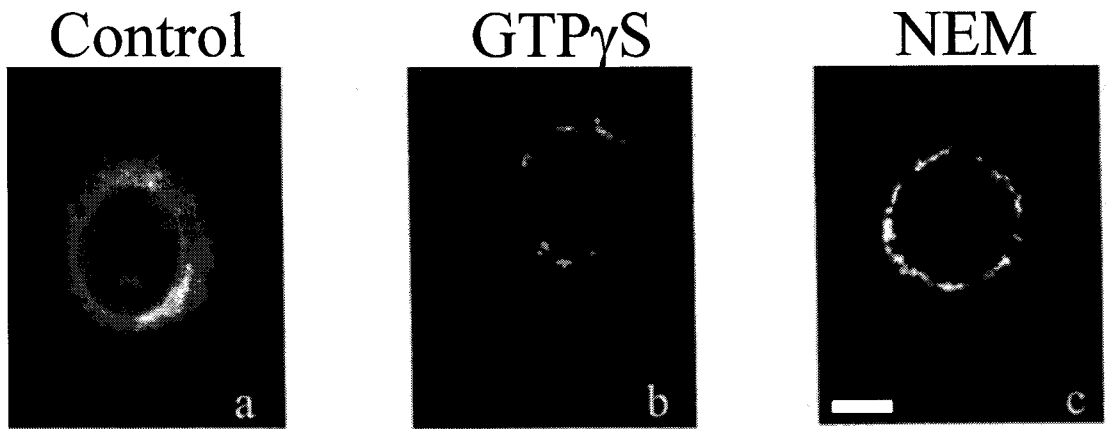


Fig. 16: Inhibición por GTP γ S y NEM. Tras la permeabilización, las células fueron incubadas a 37°C durante 1 h. en medio de ensayo conteniendo 5 mg/ml de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP (control, a). Alternativamente, el medio de ensayo fue suplementado con 100 μ M de GTP γ S (b) o 1 μ M de N-etilmaleimida (NEM, c). Las imágenes muestran la inmunolocalización de α -manosidasa II. Barra, 20 μ m.

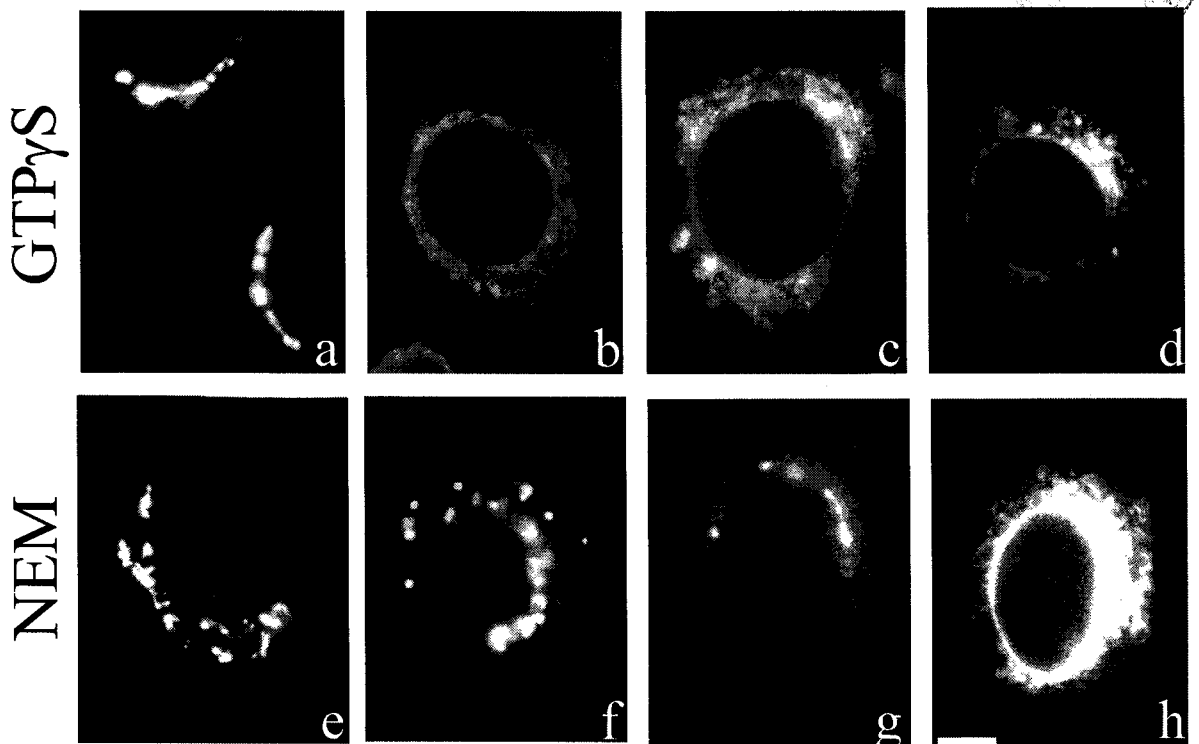


Fig. 17: Análisis del tiempo de actuación de GTP γ S y NEM. Las células permeabilizadas fueron incubadas a 37°C con una alta concentración de proteínas citosólicas (5mg/ml) y sistema regenerador de ATP. A los tiempos indicados 100 μ M de GTP γ S o bien 1 μ M de N-etilmaleimida (NEM) fueron añadidos al medio de ensayo, continuando la incubación hasta completar 1 h. de tratamiento. Después fueron fijadas y teñidas para inmunofluorescencia con anticuerpo anti- α -manosidasa II. Barra, 20 μ m.

Incubamos células permeabilizadas con una alta concentración de proteínas citosólicas y en presencia continua de GTP γ S durante 1 h a 37°C. En estas condiciones, el complejo de Golgi mantuvo su organización característica del periodo interfásico (Fig. 18a). Observamos, no obstante, que numerosas vesículas cubiertas (60-70 nm) se encontraban asociadas a las cisternas del Golgi. Teniendo en cuenta que el proceso de desorganización parecía tener lugar mediante la formación de vesículas (Fig. 8a-b), es probable que GTP γ S inhibiese el desprendimiento de las mismas y/o posterior pérdida de su cubierta. Así pues, estos datos sugieren que las vesículas cubiertas actuarían como intermediarios en la desorganización de las cisternas del Golgi, promovida por factores citosólicos.

Como se comentó anteriormente la actividad inhibidora de GTP γ S, a diferencia de NEM, únicamente se manifestó durante los primeros instantes del proceso, coincidiendo con el tiempo de vesicularización del Golgi. Llevamos a cabo, entonces, un experimento encaminado a determinar el destino de tales vesículas. Las células permeabilizadas fueron primero incubadas con una alta concentración de factores citosólicos y en ausencia de inhibidor durante 10 min, a fin de permitir la formación de vesículas. Posteriormente, añadimos NEM al ensayo y continuamos la incubación hasta completar 1 h (Fig. 18b). En las células así tratadas el área perinuclear contenía únicamente diferentes tipos de vesículas no cubiertas; las cisternas y las pequeñas vesículas cubiertas observadas durante el tratamiento con GTP γ S estaban ausentes. Aparentemente, NEM bloqueó la fusión con el

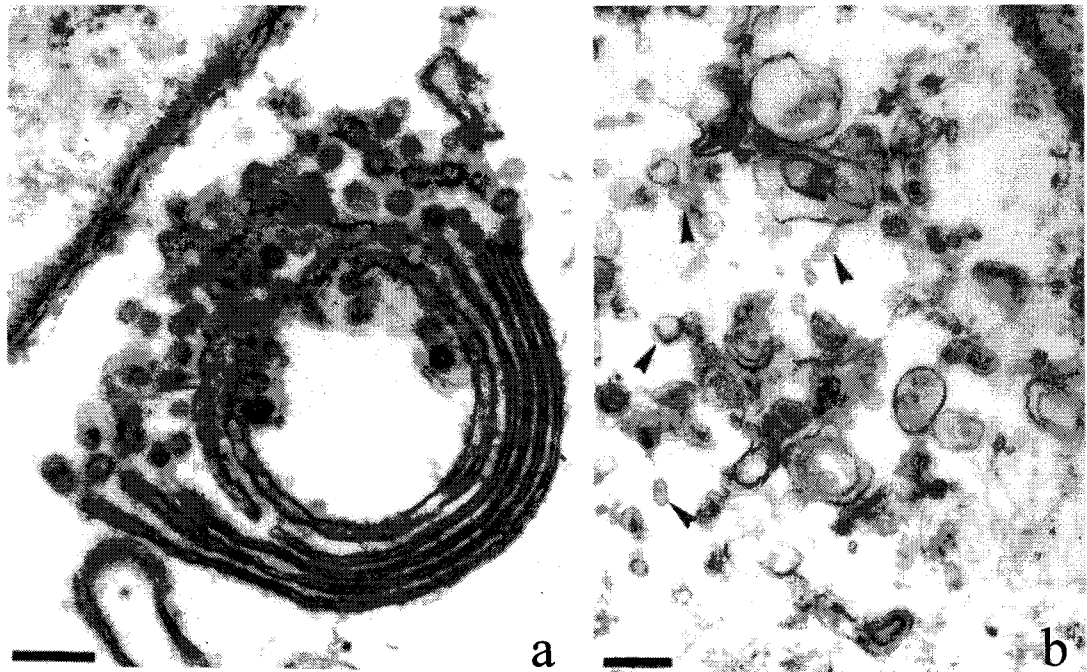


Fig. 18: Identificación de intermediarios vesiculares en el transporte retrógrado inducido por factores citosólicos. a: Las células permeabilizadas fueron incubadas a 37°C durante 1 h. con 5 mg/ml de proteínas citosólicas, sistema regenerador de ATP y 100 μ M de GTP γ S. **b:** Después de 10 min de incubación con 5 mg/ml de proteínas citosólicas, sistema regenerador de ATP y en ausencia del inhibidor, 1 μ M de NEM fue añadido al medio de ensayo, continuando la incubación hasta completar 1 h. Las células fueron fijadas y procesadas para microscopía electrónica. Las cabezas de flechas indican la presencia de vesículas no cubiertas. Barra, 0.2 μ m.

retículo endoplásmico de las vesículas, una vez éstas ya se habían desprendido de su cubierta proteica externa.

En definitiva, los factores citosólicos promoverían la desorganización del complejo de Golgi mediante la formación de vesículas cubiertas a partir de las cisternas. Esta parte del proceso sería inhibida por GTP γ S. En una etapa posterior, las vesículas ya evaginadas perderían su cubierta y acabarían fundiendo su membrana con la del retículo endoplásmico. NEM inhibiría tal fusión.

La acción de los factores citosólicos sobre las membranas del Golgi no cursa con la disociación de las proteínas de cubierta

Los resultados anteriores sugirieron un papel destacado para las proteínas de cubierta en la evaginación de las vesículas que median el transporte Golgi-retículo inducido por factores citosólicos. Ello contrasta con la acción de otros agentes que, como brefeldina A, también desorganizan el Golgi y promueven su transporte retrógrado al retículo endoplásmico [19]. Un efecto temprano en las células tratadas con brefeldina A es la inhibición de la asociación de las proteínas de cubierta conocidas genéricamente como COP I a las membranas de Golgi [9]. Como consecuencia, tales proteínas COP I permanecen mayormente disociadas y, al ser detectadas mediante inmunofluorescencia, dan lugar a una tinción difusa, típica de proteínas citosólicas no asociadas a membranas. Precisamente el efecto brefeldina

A deriva de la imposibilidad de asociación de las COP I al Golgi [27]. En tal sentido, la presencia de cubiertas citoplásmicas alrededor de las vesículas inducidas por los factores citosólicos (Figs. 8b, 18a) podría indicar que el mecanismo de actuación de éstos últimos es diferente al desencadenado por brefeldina A. Estudiamos, por tanto, la localización de una de las proteínas COP I, llamada β -COP, durante el curso temporal de la redistribución de manosidasa II al retículo endoplásmico (Fig. 19). En células control intactas la tinción inmunofluorescente para β -COP se localizó a nivel del área perinuclear de Golgi y en acúmulos o puntos dispersos por el citoplasma (fig. 19a). Al exponer células permeabilizadas a una alta concentración de citosol, las membranas de Golgi, detectadas mediante la tinción para manosidasa II, experimentaron redistribución (Fig. 19a'-c'). Por su parte, β -COP continuó asociado a membranas remanentes y acúmulos citoplásmicos (Fig. 19b-c). En ningún momento durante la redistribución de manosidasa II se observó una tinción enteramente citosólica para esta proteína de cubierta. Junto con los datos ultraestructurales (Fig. 18a), este resultado pone de manifiesto la participación activa de las proteínas de cubierta COP I en el proceso de redistribución del Golgi promovido por factores citosólicos.

Proteínas G heterotriméricas regulan el transporte retrógrado inducido por factores citosólicos

La inhibición por GTP γ S puso de manifiesto la implicación de proteínas de unión al GTP (llamadas proteínas G) en el proceso de

desorganización y redistribución del Golgi. GTP γ S activa tanto a proteínas G monoméricas como triméricas. En tal sentido, AIF₍₃₋₅₎ es un agente más selectivo puesto que únicamente activa a proteínas G heterotriméricas [17]. Tras su adición al medio de ensayo, AIF₍₃₋₅₎ inhibió la acción de las proteínas citosólicas sobre el complejo de Golgi (Fig. 20b). Incluso tras prolongados periodos de incubación con elevadas concentraciones de proteínas citosólicas, la distribución intracelular típica de manosidasa II no experimentó cambios significativos en presencia de AIF₍₃₋₅₎. Se trataba, por tanto, de un bloqueo altamente específico que evidenciaba la participación de proteínas G triméricas en la regulación del proceso. Otros dos resultados experimentales apoyaron esta idea. Por un lado, suplementamos el medio de ensayo con subunidades $\beta\gamma$ pertenecientes a transducina (G_t), una proteína G que participa en la traducción química de señales luminosas. Con ello pretendíamos ocasionar una inhibición generalizada de las proteínas G al combinarse las subunidades $\beta\gamma$ añadidas con las subunidades α presentes en las células, formándose complejos triméricos ($\alpha\beta\gamma$) inactivos [11]. Como muestra la Fig. 20c la redistribución del Golgi fue inhibida por las subunidades $\beta\gamma$. Finalmente, ensayamos los efectos del mastoparan, un péptido que, al mimificar la estructura de un receptor activado, estimula una subclase particular de proteínas G (G_i/G_o) [67]. De nuevo, los factores citosólicos fueron incapaces de inducir la redistribución del Golgi en presencia de mastoparan (Fig. 20d).

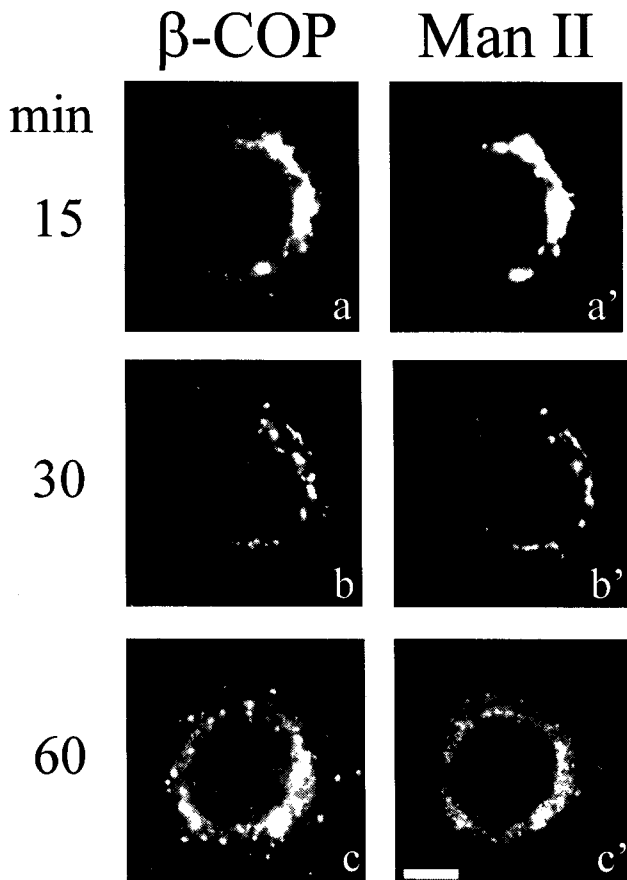


Fig. 19: Redistribución de β -COP. Las células fueron permeabilizadas, incubadas a 37°C con 5 mg/ml de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP. A los tiempos indicados fueron fijadas y doblemente teñidas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra β -COP y α -manosidasa II. Barra, 20 μ m.

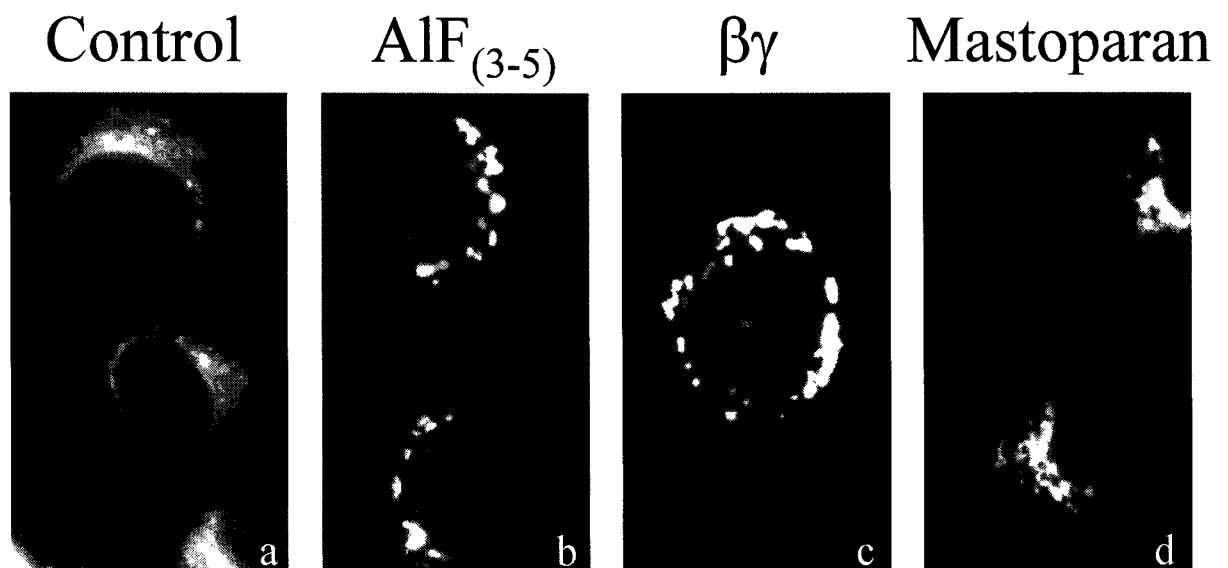


Fig. 20: Implicación de las proteínas G heterotriméricas. Tras su permeabilización, las células fueron incubadas a 37°C durante 1 h con 5 mg/ml de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP (control, a). En otras incubaciones el medio de ensayo fué suplementado con 50 μ M de $AlCl_3$ y 30 μ M de NaF ($AlF_{(3-5)}$, b) o bien con 5 μ M de subunidades $\beta\gamma$ de transducina (c) ó 50 μ M de mastoparán (d). Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia con anti- α -manosidasa II. Barra, 20 μ m.

Diferentes tipos de proteínas G controlan el transporte retrógrado inducido por factores citosólicos

Puesto que tanto la activación (con $AlF_{(3-5)}$) como la inhibición (con subunidades $\beta\gamma$ de transducina) de las proteínas G impidieron la acción de los factores citosólicos, consideramos la posibilidad de que diferentes tipos de proteínas G, activadoras (G_s) e inhibidoras (G_i), regulasen de forma coordinada el proceso.

G_s :

Con el fin de determinar la participación de este tipo de proteínas G estudiamos los efectos derivados del tratamiento con toxina del cólera. La reacción de ADP-ribosilación catalizada por esta toxina afecta selectivamente a las subunidades α_s , las cuales no pueden entonces hidrolizar GTP, quedando, por tanto, disociadas de las subunidades $\beta\gamma$ y en estado de permanente activación [11]. La adición de toxina del cólera al medio de ensayo no afectó a la redistribución de manosidasa II. Observamos, no obstante, un cambio importante en la sensibilidad de las células permeabilizadas ante los factores citosólicos. En las células pretratadas con toxina del cólera la desorganización del Golgi se produjo a una concentración de proteínas citosólicas inferior (10 veces menor) de la habitualmente requerida para inducir el proceso (Fig. 21a-b). Este resultado sugirió, por tanto, la participación de una proteína G_s activadora del proceso. Llevamos a cabo entonces una aproximación inversa, consistente en bloquear las subunidades α_s endógenas mediante la adición al ensayo de un anticuerpo específico contra ellas. En tales

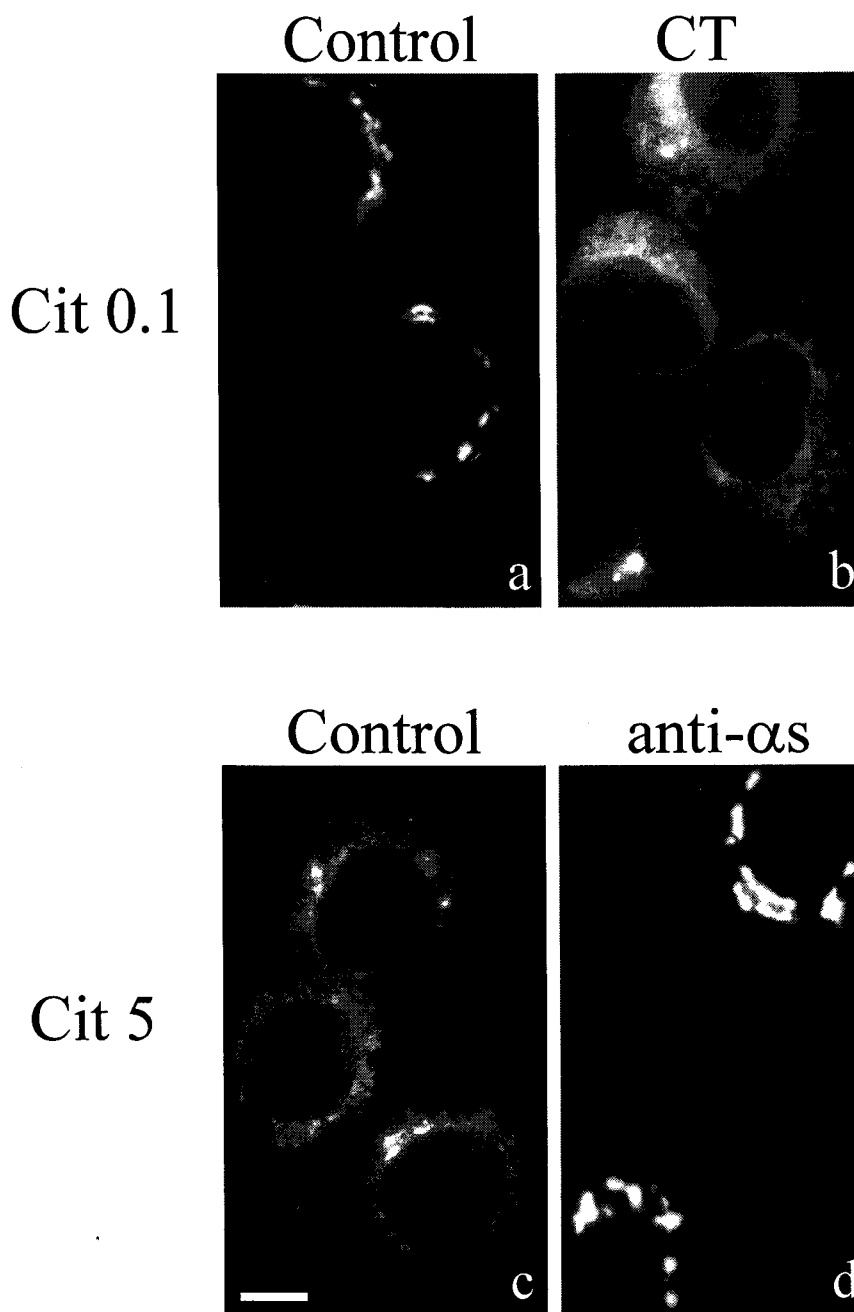


Fig. 21: Participación de proteínas Gs. a-b: Las células fueron (b) o no (control, a) tratadas con 1 mg/ml de la toxina del cólera (TC) durante 1 h. con baja concentración (0.1 mg/ml) de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP. c-d: Las células permeabilizadas fueron incubadas a 37°C durante 1 h con alta concentración (5 mg/ml) de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP en presencia (d) o no (c) de anticuerpo contra la subunidad G α s. La tinción se corresponde con la detección de α -manosidasa II. Barra, 20 μ m.

condiciones, una alta concentración de proteínas citosólicas fue insuficiente para provocar la desorganización del Golgi y su posterior redistribución al retículo endoplásmico (Fig. 21c-d).

G_i :

De igual forma, analizamos los efectos resultantes del tratamiento con la toxina de pertussis, la cual cataliza la ADP-ribosilación de las subunidades α_i . Como consecuencia, el complejo trimérico G_i es incapaz de interaccionar con receptores y permanece permanentemente inactivo [11]. En las células pretratadas con toxina de pertussis y posteriormente permeabilizadas, una baja concentración (0.1 mg/ml) de factores citosólicos fue suficiente para inducir la desorganización y redistribución del Golgi (Fig. 22a-b). Así pues, de nuevo observamos una potenciación del efecto aunque, en este caso, como resultado de una inhibición de las proteínas G_i . Ello podría interpretarse como prueba de que, en condiciones control, este tipo de proteínas G regulan de forma inhibitoria el proceso. Así, la adición al ensayo de anticuerpos bloqueantes de las subunidades α_i permitió la manifestación del fenómeno incluso a baja concentración de proteínas citosólicas (Fig. 22c).

Por lo tanto, los datos indican que la acción de los factores citosólicos sobre el Golgi está modulada por la acción concertada de un conjunto de proteínas G triméricas, activadoras (G_s) e inhibitoras (G_i), las cuales ejercerían influencias reguladoras opuestas. Tanto la

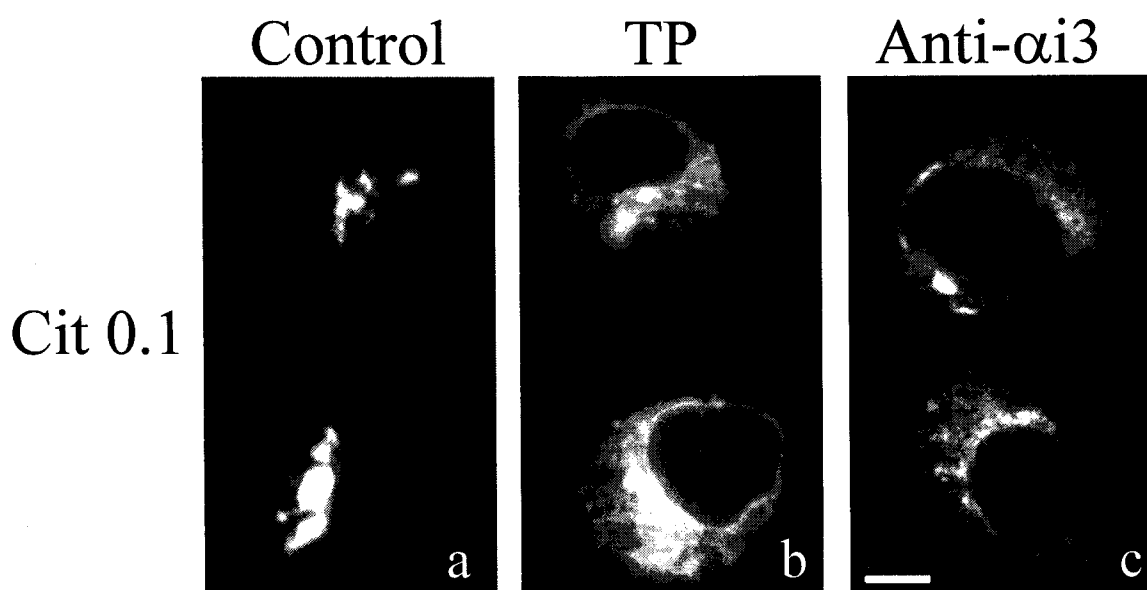


Fig. 22: Participación de proteínas Gi. Las células fueron (b) o no (a, c) tratadas con 0.5 mg/ml de la toxina de pertussis (TP) durante 16 h. a 37°C 1 h con baja concentración (0.1 mg/ml) de proteínas citosólicas y sistema regenerador de ATP. c: Anticuerpos contra la subunidad G α i fueron añadidos al medio de ensayo. El procesamiento para inmunofluorescencia se llevó a cabo con anticuerpo anti- α -manosida II. Barra, 20 μ m.

activación de las proteínas activadoras, G_s , como la inhibición de las proteínas inhibidoras, G_i , promoverían el transporte retrógrado Golgi-retículo mediado por factores citosólicos.

Efecto del AMPc sobre el transporte Golgi-retículo mediado por factores citosólicos

Las proteínas G triméricas presentes en la membrana plasmática forman parte de cadenas moleculares de señalización química en las que intervienen también segundos mensajeros y enzimas fosforiladoras del tipo de proteín quinasas específicas [11]. La participación de proteínas G en la regulación del transporte Golgi-retículo podría evidenciar la existencia de rutas de señalización parecidas que operasen a nivel de membranas intracelulares. La organización estructural y funcionalidad de ciertos orgánulos como el complejo de Golgi podrían de hecho estar bajo el control de tales vías de traducción de señales. Con esta idea en mente, quisimos examinar la influencia ejercida por una molécula común en los procesos de señalización, el AMPc. La adición de este segundo mensajero al medio de ensayo potenció el proceso de desorganización y redistribución del Golgi inducido por factores citosólicos (Fig. 23).

Estos resultados, por tanto, sugieren la existencia de rutas de señalización, de las que formarían parte diversos tipos de proteínas G heterotriméricas, segundos mensajeros como el AMPc y posiblemente,

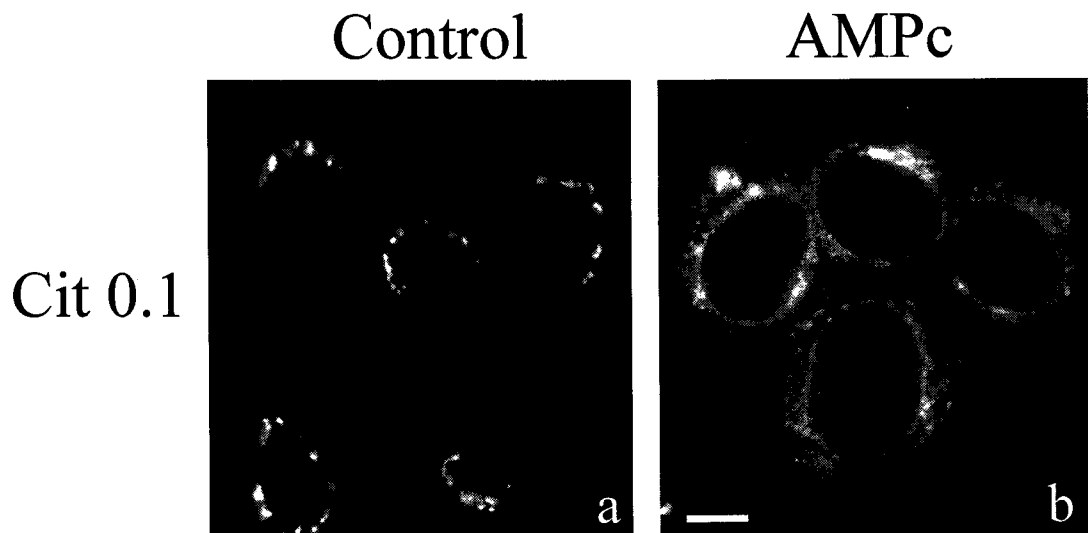


Fig 23: Influencia del AMPc sobre el transporte retrógrado Golgi retículo mediado por factores citosólicos. Las células permeabilizadas fueron incubadas a 37°C durante 1 h. en medio de ensayo conteniendo sistema regenerador de ATP y baja concentración (0.1 mg/ml) de proteínas citosólicas (control, a). 100 μ M de AMPc fueron añadidos al medio de ensayo de las células mostradas en b. La tinción inmunofluorescente se corresponde con la detección de α -manosidasa II. Barra, 20 μ m.

proteínas quinasas, encargadas de regular la organización morfológica del Golgi, así como sus actividades funcionales, particularmente aquellas relacionadas con el envío al retículo endoplásmico de vesículas de transporte retrógrado.

DISCUSSION

Transporte retrógrado en células permeabilizadas con estreptolisina O

En el presente trabajo hemos descrito la redistribución de los componentes del complejo de Golgi en el retículo endoplásmico, originada por la incubación de células permeabilizadas con un exceso de proteínas citosólicas. En nuestra opinión, este proceso puede ser considerado como el resultado de una amplificación del transporte retrógrado que, *in vivo*, tiene lugar durante la recuperación desde el Golgi de las proteínas endógenas del retículo [48]. Así lo sugiere el hecho de que las membranas vesicularizadas del complejo de Golgi fusionen específicamente con las del retículo y que otros orgánulos, como endosomas o lisosomas, no experimenten cambios morfológicos destacables. Dado que el efecto observado depende exclusivamente de proteínas celulares y no es inducido por un tipo de droga o compuesto artificial, pensamos que es razonable relacionarlo con el transporte retrógrado fisiológico. En tal sentido, los resultados obtenidos permiten extraer algunas conclusiones sobre los factores implicados en el transporte retrógrado *in vivo*. Ello es especialmente interesante teniendo en cuenta que, pese a su relevancia para la fisiología celular [36], esta vía de transporte es poco conocida en términos moleculares. Sin duda esto se debe a la dificultad que entraña su estudio en células intactas, para las cuales no existe aún un método de ensayo que permita el análisis particular de esta ruta. En este sentido, el uso de células permeabilizadas con estreptolisina O supone una forma de obviar estas dificultades y abre la posibilidad de identificar los factores que regulan y hacen posible el transporte retrógrado. Sin embargo, es importante destacar que el sistema utilizado no reproduce totalmente las condiciones *in vivo*. Así, en interfase

las vías anterógrada y retrógrada ocurren simultáneamente y el Golgi mantiene su organización estructural característica. Es obvio que en nuestro ensayo se produce una potenciación de la ruta retrógrada lo cual, junto con una disminución del transporte anterógrado retículo-Golgi, explicaría la desorganización de este último orgánulo. De todas formas, es muy probable que el mecanismo responsable de la redistribución de las membranas del Golgi en el retículo sea semejante en ambos casos, lo cual justificaría la utilización de las células permeabilizadas como aproximación experimental.

Diferencias con el efecto brefeldina A.

Aparentemente el efecto ocasionado por los factores citosólicos en las células permeabilizadas es semejante al inducido por brefeldina A en células intactas. También en este caso se produce la desorganización del complejo de Golgi y posterior fusión de sus membranas con el retículo endoplásmico [27]. Sin embargo, existen importantes diferencias entre ambos fenómenos.

Los estudios realizados con brefeldina A han indicado que esta droga ocasiona la inactivación de arf y, como consecuencia, la inhibición de la asociación de las proteínas de cubierta COP I a las membranas del Golgi [19]. De hecho, el tratamiento con brefeldina A se manifiesta inicialmente como un cambio en la distribución intracelular de estas proteínas, de tal forma que, por ejemplo, β -COP redistribuye al citosol tras

2 min de exposición [9]. La interrupción del ciclo normal de asociación/disociación de las proteínas de cubierta a las membranas de Golgi constituye, según algunos autores, la causa de la desorganización experimentada por este orgánulo en presencia de brefeldina A. Por el contrario, nuestras observaciones ultraestructurales ponen de manifiesto que la desorganización del Golgi inducida por factores citosólicos se efectúa mediante evaginación de numerosas vesículas cubiertas (Fig. 18a). Es más, no hemos detectado por inmunofluorescencia disociación de β -COP de las membranas de Golgi durante el curso de la redistribución de éstas al retículo endoplásmico (Fig. 19).

Por otro lado, en tanto la redistribución del Golgi inducida por brefeldina A es dependiente de microtúbulos [26], en las células permeabilizadas e incubadas con una alta concentración de proteínas citosólicas el proceso no necesita microtúbulos intactos (Fig. 15f).

No obstante, el dato diferencial más significativo se refiere al mecanismo mismo de desorganización del Golgi. En el caso de las células tratadas con brefeldina A la desorganización parece ocurrir mediante la emisión de túbulos a partir de las cisternas del Golgi [26]. Tales estructuras tubulares experimentarían un crecimiento progresivo en longitud a costa de las propias cisternas y terminarían fundiendo con el retículo endoplásmico. En nuestro estudio con células permeabilizadas e incubadas con un exceso de proteínas citosólicas no hemos detectado este tipo de intermediarios tubulares. De hecho, las observaciones realizadas al microscopio óptico

(Fig. 7) y electrónico (Fig. 8) indican que la desorganización inducida por factores citosólicos se efectúa sin la participación de túbulos y, en cambio, podría estar mediada por vesículas. Así pues, estos datos indican que el mecanismo de actuación de las proteínas citosólicas es esencialmente diferente del de brefeldina A.

Redes tubulovesiculares

A pesar de que los factores citosólicos no parecen inducir la tubulación de las cisternas del Golgi, una vez ocurrida la redistribución de éste observamos redes tubulovesiculares en el citoplasma de las células expuestas a una alta concentración de proteínas citosólicas. Se trata de entramados tubulares ramificados con vesículas asociadas (Fig. 8c). La morfología y localización perinuclear de estas estructuras recuerda a los remanentes de Golgi de las células tratadas con brefeldina A. En este caso, se demostró que las redes contenían proteínas integrales del Golgi y, al retirar la droga, participaron en la reorganización del orgánulo [16]. Redes similares se han descrito también en células mitóticas [65], en Golgis aislados e incubados con citosol mitótico [34] y en células tratadas con ilimaquinona [59]. Así pues, las evidencias indican que, si bien en estas situaciones el Golgi se desorganiza por mecanismos diferentes, en todas ellas se originan redes tubulovesiculares como estructuras residuales a partir de las cuales, en ciertos casos, es posible reorganizar el orgánulo completo.

Etapas en el transporte retrógrado Golgi-retículo inducido por factores citosólicos

El uso de agentes inhibidores del tráfico vesicular nos ha permitido delimitar fases en el transporte retrógrado Golgi-retículo inducido por factores citosólicos. Así, el tratamiento con GTP γ S ha puesto de manifiesto la participación de vesículas cubiertas de 50-60 nm en la desorganización del Golgi (Fig. 18a). Por analogía con el mecanismo de actuación de este nucleótido en otros pasos del transporte intracelular, es de suponer que GTP γ S inhiba la disociación de las proteínas de cubierta. En tales condiciones, se acumulan vesículas cubiertas que son incapaces de reconocer y fundir con el compartimento receptor [31]. En ausencia de GTP γ S, en cambio, las vesículas una vez formadas perderían la cubierta y podrían asociarse y fundir con el retículo endoplásmico. Este paso de fusión es inhibido por N-etilmaleimida, de forma que este agente da lugar a la acumulación de vesículas no cubiertas (Fig. 18b). La inhibición por N-etilmaleimida sugiere la participación en el proceso de proteínas de fusión del tipo NSF [51].

Transporte retrógrado: ¿vesículas ó túbulos?

En base a los estudios realizados con brefeldina A se ha propuesto que el transporte retrógrado Golgi-retículo estaría mediado por túbulos [25]. En la formación de los túbulos no participarían las proteínas de

cubierta COP I (redistribuidas al citosol en presencia de brefeldina A), las cuales, sin embargo, se asociarían a las membranas de Golgi en el momento de formar vesículas para el transporte anterógrado [50]. Sin embargo, esta idea contrasta con datos recientes que indican un papel esencial de las proteínas COP I en el transporte retrógrado *in vivo* [21]. Más aún, está la cuestión de considerar hasta que punto son equiparables el transporte retrógrado normal y el inducido por brefeldina A.

Por el contrario, nuestros datos sugieren que el transporte retrógrado estaría mediado por vesículas. Al haber conseguido detener el proceso de redistribución del Golgi en diferentes momentos, hemos podido monitorizar la producción y el consumo de las vesículas participantes. Así, los experimentos realizados con GTP γ S han mostrado que este agente sólo es efectivo como inhibidor al comienzo del proceso de redistribución, coincidiendo con la producción de vesículas cubiertas a partir de las cisternas del Golgi (Fig. 17). Estas mismas vesículas son las que después funden con el retículo endoplásmico en una reacción sensible a N-etilmaleimida, por lo cual el efecto inhibidor de este último agente es más prolongado en el tiempo (Fig. 17). Es evidente, por tanto, que en lo que concierne al transporte retrógrado inducido por factores citosólicos los intermediarios responsables son vesículas cubiertas evaginadas a partir de las cisternas del Golgi que, tras perder la cubierta, funden con el retículo endoplásmico.

Asimismo, nuestras observaciones concuerdan con los estudios

genéticos sobre la participación de proteínas de cubierta en el transporte retrógrado [21]. El hecho de que β -COP permanezca asociado a las membranas de Golgi al tiempo que éstas experimentan desorganización y redistribución es una indicación de que el ciclo de asociación/disociación a membranas de estas proteínas no es alterado por los factores citosólicos.

La consideración de que tanto el transporte anterógrado como el retrógrado están mediados por poblaciones de vesículas cubiertas plantea el problema de determinar la significación funcional de los túbulos que el Golgi forma en determinadas condiciones. Se ha sugerido que la producción de túbulos es una propiedad inherente a las membranas de Golgi. Únicamente cuando existe la posibilidad de asociación de las proteínas de cubierta los túbulos no llegarían a formarse, pues, en su lugar, se evaginarían vesículas [19]. Sin embargo, un estudio reciente indica lo contrario. La incubación de fracciones aisladas de Golgi con preparaciones de citosol depletadas de COP I ha mostrado que, en ausencia de proteínas de cubierta, no se producen, como era de esperar, vesículas de transporte, pero tampoco túbulos [40]. Asimismo, el tratamiento con ilimaquinona ocasiona la vesicularización del Golgi y desprendimiento de las proteínas de cubierta a él asociadas. Aún así, no se observan túbulos membranosos emergiendo del Golgi en las células incubadas con esta droga [59]. Por el contrario, la formación de túbulos parece guardar relación con determinadas situaciones experimentales. Además del tratamiento con brefeldina A, se han descrito extensiones tubulares de las cisternas del Golgi en condiciones de bajo nivel de ATP [6] y tras la incubación de las células a baja temperatura (15-16°C) [60]. En este último caso, las

proteínas de cubiertas permanecen asociadas a las membranas de Golgi durante la emisión de túbulos [26]. Puesto que todas ellas son situaciones no fisiológicas, es improbable que las estructuras tubulares observadas estén relacionadas con un tipo de transporte particular entre orgánulos. Por el contrario, los efectos de estos tratamientos podrían evidenciar la afectación de componentes estabilizadores del propio complejo de Golgi. En tal sentido, es de destacar que en nuestro sistema experimental la acción de los factores citosólicos es estrictamente dependiente de ATP (Fig. 15a) y temperatura fisiológica (Fig. 15). Precisamente estos requerimientos son los que cabría esperar de un proceso de transporte *in vivo*.

Papel de los factores citosólicos en la potenciación del transporte retrógrado Golgi-retículo.

Si bien desconocemos la naturaleza de los factores citosólicos causantes de la desorganización y redistribución del Golgi, es posible especular sobre el mecanismo de actuación de algunos de ellos. En primer lugar, la preparación de proteínas citosólicas utilizada contiene factores que claramente estimulan la evaginación de vesículas. Podría tratarse de proteínas hidrofílicas que, no obstante, presenten algún tipo de mecanismo de asociación a membranas, dada la afinidad mostrada hacia la matriz de fenil-Sefarosa (Fig. 14). Ello les permitiría interactuar con lugares específicos en el Golgi, promoviendo la deformación de sus membranas y el desprendimiento de las vesículas. Proteínas citosólicas con estas propiedades han sido identificadas en múltiples pasos del tráfico vesicular

entre compartimentos [50]. Por otro lado, entre los factores citosólicos implicados se incluirían proteínas de fusión. Tratándose de un proceso de fusión entre membranas distintas (fusión heteróloga) parece lógico suponer la participación de NSF y SNAPs [32]. De hecho, la inhibición de este paso por N-etilmaleimida así lo sugiere.

La capacidad de los factores citosólicos para influir en la organización estructural del Golgi es otro de los hallazgos más destacables del presente estudio. Generalmente se considera que durante la interfase el Golgi posee una estructura estable, resultado de un equilibrio entre ingreso y exportación de vesículas. Únicamente durante la mitosis el orgánulo se modifica debido a una paralización del flujo anterógrado [65]. Sin embargo, es evidente a partir de nuestras observaciones que tal equilibrio es objeto de regulación constante por parte de la célula. Esta, mediante la potenciación o inhibición de la producción de vesículas de distintos tipos, conseguiría adecuar la estructura del orgánulo a las necesidades de cada momento. Es posible, entonces, que la organización interfásica del Golgi esté sujeta a cambios reversibles modulados por factores citosólicos.

Regulación del transporte retrógrado por proteínas G heterotriméricas y segundos mensajeros.

Entre los factores reguladores que intervendrían en el control del transporte retrógrado Golgi-retículo endoplásmico hemos identificado a proteínas G heterotriméricas y AMPc. La participación de proteínas G

heterotriméricas, evidenciada en incubaciones con $AlF_{(3-5)}$ (Fig. 20b), subunidades $\beta\gamma$ (Fig. 20c) y el péptido mastoparén (Fig. 20d), amplia el número de reacciones de transporte reguladas por este tipo de moléculas [4]. Además, mediante la utilización de toxinas bacterianas (Figs. 21b y 22b) y anticuerpos específicos contra subunidades α particulares (Figs. 21d y 22c) hemos podido determinar la participación de, al menos, dos tipos de proteínas G con efectos opuestos. Por un lado, la activación de G_s estimula el transporte retrógrado, en tanto que la activación de G_i lo inhibe. Una situación similar parece gobernar la producción de gránulos secretores a partir del TGN [24]. Es posible, entonces, que tanto la estructura como la función de los orgánulos secretores dependa de la acción concertada de una serie de proteínas G, las cuales directa o indirectamente actuarían sobre moléculas efectoras específicas pertenecientes a la maquinaria de transporte vesicular. Sin duda, la identificación de todas las moléculas señalizadoras implicadas (receptores, efectores, segundos mensajeros, etc.) constituye una de las prioridades en la investigación en este campo. Por nuestra parte, hemos comprobado que una concentración elevada de AMPc estimula la acción de los factores citosólicos sobre el transporte retrógrado (Fig. 23b). La participación de este segundo mensajero es apoyada por estudios recientes sobre el transporte de la toxina de shiga desde el Golgi hasta el retículo [52].

Los datos obtenidos sobre la influencia ejercida por el AMPc y proteínas G_s y G_i sobre el proceso de redistribución del Golgi promovido por factores citosólicos permiten proponer la existencia de un mecanismo de traducción de señales responsable de su regulación. Tal ruta de

señalización podría funcionar en forma similar a la cadena de moléculas señalizadoras que, a nivel de la membrana plasmática, originan cambios en la concentración intracelular de segundos mensajeros como el AMPc en respuesta a estímulos extracelulares [11]. Alternativamente, es posible que las rutas de señalización que operan a nivel de orgánulos esten constituidas según un esquema diferente. En cualquier caso, la identificación de las moléculas participantes constituye el primer paso hacia el conocimiento de tales vías. En este sentido, es importante destacar la caracterización de proteínas G heterotriméricas endógenas de Golgi y TGN [7, 18, 35, 56]. Asimismo, en lo referente al transporte retrógrado son relevantes los estudios realizados con el receptor, *erd 2*, de la secuencia KDEL presente en las proteínas endógenas de la luz del retículo. Por ejemplo, la formación, a nivel de Golgi, de complejos ligando-receptor estimula el transporte retrógrado de éstos [23].

Podemos, por tanto, utilizar los escasos datos que poseemos sobre la regulación del transporte retrógrado Golgi-retículo endoplásmico para, tentativamente, establecer un paralelismo con las rutas de traducción de señales químicas que están caracterizadas en la membrana plasmática. Aquellas proteínas del retículo endoplásmico que fortuitamente viajan hasta el complejo de Golgi son reconocidas por una molécula receptora específica, uniéndose a ellas. Al igual que la activación de los receptores presentes en la membrana plasmática da lugar a la estimulación de proteínas G triméricas, también en el caso del transporte retrógrado la formación de complejos ligando-receptor activaría a determinadas proteínas G. Estas últimas, a través de cambios en la concentración de

segundos mensajeros como el AMPc, activarían a ciertas quinasas que, mediante fosforilación de determinados sustratos, promoverían la asociación de las proteínas de cubierta a la membrana y, con ello, la formación de vesículas de transporte retrógrado.

Obviamente se trata de un esquema sobre el que continuar trabajando en la identificación de las moléculas señalizadoras. No obstante, es alentador pensar que, por ejemplo, el receptor de KDEL es una proteína integral de membrana con siete segmentos transmembrana [22], un tipo de organización molecular semejante al de los receptores de membrana plasmática acoplados a proteínas G heterotriméricas. Es posible, por tanto, que se trate de dos versiones (membrana plasmática/Golgi) de una misma obra (traducción de señales), si bien interpretada por actores (moléculas) distintos en cada caso.

CONCLUSIONES

Las observaciones realizadas durante el presente estudio nos permiten concluir que:

1. Factores citosólicos promueven la desorganización del complejo de Golgi y la fusión de sus membranas con las del retículo endoplásmico, en un proceso que reproduce el transporte retrógrado existente *in vivo* entre ambos orgánulos.

2. El transporte retrógrado inducido por factores citosólicos está mediado por vesículas y es regulado por proteínas G heterotriméricas y AMPc.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barinaga, M.: Secrets of secretion revealed. *Science*. **260**, 487-489 (1993).
- [2] Bergmann, J. E.: Using temperature-sensitive mutants of VSV to study membrane protein biogenesis. *Meth. Cell Biol.* **32**, 85-110 (1989).
- [3] Bhakdi, S., J. Tranum-Jensen: Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **107**, 147-223 (1987).
- [4] Bomsel, M., K. Mostov: Role of heterotrimeric G proteins in membrane traffic. *Mol. Biol. Cell.* **3**, 1317-1328 (1992).
- [5] Clary, D. O., J. E. R. I. C. Griff: SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell.* **61**, 709-721 (1990).
- [6] Cluett, E. B., S. A. Wood, M. Banta, W. J. Brown: Tubulation of Golgi membranes *in vivo* and *in vitro* in the absence of brefeldin A. *J. Cell Biol.* **120**, 15-24 (1993).
- [7] Colombo, M. I., L. S. Mayorga, I. Nishimoto, E. M. Ross, P. D. Stahl: G_s regulation of endosome fusion suggests a role for signal transduction pathways in endocytosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 14919-14923 (1994).

- [8] Donaldson, J. G., D. Cassel, R. A. Kahn, R. D. Klausner: ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein β -COP to Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 6408-6412 (1992).
- [9] Donaldson, J. G., J. Lippincott-Schwartz, R. D. Klausner: Dissociation of a 110-kD peripheral membrane protein from the Golgi apparatus is an early event in brefeldin A action. *J. Cell Biol.* **111**, 2295-2306 (1990).
- [10] Farquhar, M. G.: Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1**, 447-488 (1985).
- [11] Gilman, A. G.: G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* **56**, 615-649 (1987).
- [12] Griffiths, G., K. Simons: The *trans* Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science.* **2324**, 438-443 (1986).
- [13] Hammond, C., A. Helenius: Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **126**, 41-52 (1994).
- [14] Hansen, S. H., J. E. Casanova: $G\alpha_s$ stimulates transcytosis and apical secretion in MDCK cells through cAMP and protein kinase A. *J. Cell Biol.* **126**, 677-687 (1994).

- [15] Hauri, H.-P., A. Schweizer: The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 600-608 (1992).
- [16] Hidalgo, J., R. Garcia-Navarro, F. Gracia-Navarro, J. Perez-Vilar, A. Velasco: Presence of Golgi remnant membranes in the cytoplasm of brefeldin A-treated cells. *Eur. J. Cell Biol.* **58**, 214-227 (1992).
- [17] Kahn, R. A.: Fluoride is not an activator of the smaller (20-25 kDa) GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **266**, 15595-15597 (1991).
- [18] Kehlenbach, R. H., J. Matthey, W. B. Huttner: XL α is a new type of G protein. *Nature.* **372**, 804-809 (1994).
- [19] Klausner, R. D., J. G. Donaldson, J. Lippincott-Schwartz: Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *Cell.* **116**, 1071-1080 (1992).
- [20] Kreis, T. E.: Microinjected antibodies against the cytoplasmic domain of vesicular stomatitis virus glycoprotein block its transport to the cell surface. *EMBO J.* **5**, 931-941 (1986).
- [21] Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Démollière, R. Duden, S. D. Emr, H. Riezman, P. Cosson: Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell.* **79**, 1119-1207 (1994).
- [22] Lewis, M. J., H. R. B. Pelham: A human homologue of the yeast



HDEL receptor. *Nature*. **348**, 162-163 (1990).

[23] Lewis, M. J., H. R. B. Pelham: Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*. **68**, 353-364 (1992).

[24] Leyte, A., F. A. Barr, R. H. Kehlenbach, W. B. Huttner: Multiple trimeric G-proteins on the trans-Golgi network exert stimulatory and inhibitory effects on secretory vesicle formation. *EMBO (Eur. Mol. Bio. Organ.) J.* **11**, 4795-4804 (1992).

[25] Lippincott-Schwartz, J.: Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* **3**, 81-88 (1993).

[26] Lippincott-Schwartz, J., J. G. Donaldson, A. Schweizer, E. G. Berger, H. P. Hauri, L. C. Yuan, R. D. Klausner: Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of Brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell*. **60**, 821-836 (1990).

[27] Lippincott-Schwartz, J., L. C. Yuan, J. S. Bonifacino, R. D. Klausner: Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*. **56**, 801-813 (1989).

[28] Luini, A., D. M. M. A.: Receptor mediated regulation of

constitutive secretion. *Trends in Cell Biology*. **3**, 290-292 (1993).

[29] Luzio, J. P., B. Brake, G. Banting, K. E. Howell, P. Braghetta, K. K. Stanley: Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (TGN 38). *Biochem. J.* **270**, 97-102 (1990).

[30] Mallabiabarrena, A., V. Malhotra: Vesicle Biogenesis: the coat connection. *Cell*. **83**, 667-669 (1995).

[31] Melançon, P., B. S. Glick, V. Malhotra, P. J. Weidman, T. Serafini, M. L. Gleason, L. Orci, J. E. Rothman: Involvement of GTP-binding "G" proteins in transport through the Golgi stack. *Cell*. **51**, 1053-1062 (1987).

[32] Mellman, I.: Enigma variations: Protein mediators of membrane fusion. *Cell*. **82**, 869-872 (1995).

[33] Mellman, I., K. Simons: The Golgi complex: *in vitro* veritas? *Cell*. **68**, 829-840 (1992).

[34] Misteli, T., G. Warren: A role for tubular networks and a COP I-independent pathway in the mitotic fragmentation of Golgi stacks in a cell-free system. *J. Cell Biol.* **130**, 1027-1039 (1995).

[35] Montmayeur, J.-P., E. Borrelli: Targeting of $G\alpha_{i2}$ to the Golgi by alternative splicing carboxyl-terminal region. *Science*. **263**, 95-98

(1994).

[36] Munro, S., H. R. B. Pelham: A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. **48**, 899-907 (1987).

[37] Nilsson, T., S. M. H. Hoe, C. Rabouille, R. Watson, F. Hunte, G. Watzel, E.G. Berger, G. Warren: Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells. *EMBO journal*. **13**, 562-574 (1994).

[38] Nilsson, T., G. Warren: Retention and retrieval in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology*. **6**, 517-521 (1994).

[39] Novick, P., P. Brennwald: Friends and family: the role of the rab GTPases in vesicular traffic. *Cell*. **75**, 597-601 (1993).

[40] Orci, L., D. J. Palmer, M. Ravazzola, A. Perrelet, M. Amherdt, J. E. Rothman: Budding from Golgi membranes requires the coatamer complex of non-clathrin coat proteins. *Nature (Lond.)*. **362**, 648-652 (1993).

[41] Palade, G.: Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science*. **189**, 347-358 (1975).

[42] Pelham, H. R. B.: Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **7**, 913-918 (1988).

- [43] Pelham, H. R. B., S. Munro: Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *cell*. **75**, 603-605 (1993).
- [44] Pelham, R. B.: Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**, 1-23 (1989).
- [45] Pfeffer, S. R.: GTP-binding proteins in intracellular transport. *Trends Cell Biol.* **2**, 41-46 (1992).
- [46] Pfeffer, S. R.: Rab GTPases: master regulators of membrane trafficking. *Curr. Opin. Cel. Biol.* **6**, 522-526 (1994).
- [47] Pimplikar, S. W., K. Simons: Regulation of apical transport in epithelial cells by a Gs class of heterotrimeric G protein. *Nature (Lond.)*. **362**, 456-458 (1993).
- [48] Rose, J. K., R. W. Doms: Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 257-288 (1988).
- [49] Roth, J., E. G. Berger: Immunocytochemical localization of galactosyltransferase in HeLa cells: codistribution with thiamine pyrophosphatase in trans-Golgi cisternae. *J. Cell Biol.* **92**, 223-229 (1982).
- [50] Rothman, J. E.: Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*. **372**, 55-63 (1994).

- [51] Rothman, J. E., L. Orci: Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature (Lond.)*. **355**, 409-415 (1992).
- [52] Sandvig, K., M. Ryd, O. Garred, E. Schweda, P. K. Holm, B. v. Deurs: Retrograde transport from the Golgi complex to the ER of both shiga toxin and the nontoxic shiga B-fragment is regulated by butyric acid and cAMP. *J. Cell Biol.* **126**, 53-64 (1994).
- [53] Saraste, J., K. Svensson: Distribution of the intermediate elements operating in ER to Golgi transport. *J. Cell Sci.* **100**, 415-430 (1991).
- [54] Serafini, T., L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R. A. Kahn, J. E. Rothman: ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell.* **67**, 239-253 (1991).
- [55] Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-Bromage, S. Geromanos, P. Tempst, J. E. Rothman: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature (Lond.)*. **362**, 318-324 (1993).
- [56] Stow, J. L., J. B. d. Almedia, N. Narula, E. J. Holtzman, L. Ercolani, D. A. Ausiello: A heterotrimeric G protein, $G\alpha_{1-3}$, on Golgi membranes regulates the secretion of a heparan sulfate proteoglycan in LL-PK₁ epithelial cells. *J. Cell Biol.* **114**, 1113-1124 (1991).

- [57] Sztul, E., P. Melançon, K. E. Howell: Targeting and fusion in vesicular transport. *Trends Cell Biol.* **2**, 381-386 (1992).
- [58] Takai, Y., A. K. K. Kaibuchi M. Kawata: small GTP-binding proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* **133**, 188-229 (1992).
- [59] Takizawa, P. A., B. V. J. K. Yucel D. J. Faulkner, T. Deerinck, G. Soto, M. Ellisman, V. Malhotra: Complete vesiculation of Golgi membranes and inhibition of protein transport by anovel sea sponge metabolite, illimaquinone. *Cell.* **73**, 1079-1090 (1993).
- [60] Tang, B. L. T., S. H. Wong, X. L. Qi, S. H. Low, W. Hong: Molecular cloning, characterization, subcellular localization and dynamics of p23, the mammalian KDEL receptor. *J. Cell Biol.* **120**, 325-338 (1993).
- [61] Tanigawa, G., M. A. L. Orci M. Ravazzola, J. B. Helms, J.E. Rothman: Hidrolysis of bound GTP by ARF protein triggers uncoating of Golgi-derived COP-coated vesicles. *J.Cell. Biol.* **121**, 751-760 (1993).
- [62] Taylor, T. C., R. A. Kahn, P. Melançon: Two distinct members of the ADP-ribosylation factor family of GTP-binding proteins regulate cell-free intra-Golgi transport. *Cell.* **70**, 69-79 (1992).
- [63] Turner, J. R., A. M. Tartakoff: The response of the Golgi

complex to microtubule alterations: the roles of metabolic energy and membrane traffic in Golgi complex organization. *J. Cell Biol.* **109**, 2081-2088 (1989).

[64] Velasco, A., L. Hendricks, K. W. Moremen, D. R. P. Tulsiani, O. Touster, M. G. Farquhar: Cell type-dependent variations in the subcellular distribution of α -mannosidase I and II. *J. Cell Biol.* **122**, 39-51 (1993).

[65] Warren, G.: Membrane partitioning during cell division. *Annu. Rev. Biochem.* 323-348 (1993).

[66] Waters, M. G., J. E. R. T. Serafini: "Coatomer": a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport Vesicles. *Nature.* **349**, 248-251 (1991).

[67] Weingarten, R., L. Ransnäs, H. Mueller, L. A. Sklar, G. M. Bokoch: Mastoparan interacts with the carboxyl terminus of the α subunit of G_i . *J. Biol. Chem.* **265**, 11044-11049 (1990).

[68] Weiss, O., C. R. J. Holden R.A. Kahn: Nucleotide binding and cofactor activities of purified bovine brain and bacterially expressed ADP-ribosylation factor. *J. Biol. Chem.* **264**, 21066-21072 (1989).

Manuel Muñiz Guinea
Regulación de la estructura y función
del complejo de Golgi por factores citosólicos
y proteínas G heterotrimericas

laude

Apto cum

28

Junio

96

Q. Esp.

[Signature]

~~*[Signature]*~~

El Doctorado,

[Signature]

[Signature]

Manuel Muñiz Guinea



FBI E TD / 349

500819089

819089