

Universidad de Sevilla



**Facultad de Biología
Departamento de Biología Celular**

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL COMPLEJO p24 EN
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Memoria del trabajo realizado
en el departamento de Biología Celular
para optar al grado de Doctor por

Dña. M^a Auxiliadora Aguilera Romero

Sevilla, 2010

Director de la tesis doctoral

**Dr. Manuel Muñoz Guinea
Profesor Titular de Biología Celular
Universidad de Sevilla**

“Caminante no hay camino, se hace camino al andar”

Antonio Machado

AGRADECIMIENTOS

Siempre he pensado que lo bueno de escribir la tesis es que nos brinda la posibilidad de dar las gracias. Este primer apartado es el chivato que desvela las emociones contenidas de muchos becarios. Se convierte en un testimonio personal diferente a la vez que fascinante y además, nos permite acordarnos de las personas que nos han acompañado, apoyado, ayudado, motivado... En definitiva, muestra la experiencia vital de la persona durante la tesis y eso me encanta.

Puedo decir que llevo años recopilando agradecimientos... Llegan en forma de recuerdos, de enseñanzas, de risas... Aparecen casi sin darme cuenta y me dibujan un “gracias” mudo que quisiera expresar ahora... Porque durante esta etapa de mi vida he tenido la suerte de encontrarme con personas valientes comprometidas con su trabajo y sobre todo con grandes dosis de sentido común.

No quisiera dejarme a nadie atrás pero si lo hago espero que no se moleste y que tenga la libertad de darme un pequeño tirón de orejas para poder regalarle una disculpa.

Me gustaría dar las gracias a Manoli, a Jose Manuel, a Reme, a Chari, a Paula, a Pepe... a todos vosotros, gracias por hacer que mis mañanas comenzarán frescas y por inspirar mi día a día con vuestro ejemplo.

Gracias a Ángel y a Josefina, por apoyarme en esos primeros años en los que andaba errante entre despacho y cocina, gracias a vosotros encontré un punto estable en el que apoyarme.

Marga, Lucía, gracias por contestar mis dudas, aguantar mis idas y venidas, y, sobre todo, por acogerme y hacerme sentir como en casa a pesar de la timidez de los primeros días.

Gracias también a Pietro, Luis, Simona, Cristiano, Lidia, Liza... por compartir los almuerzos y hacer de ellos una experiencia única al enriquecerlos con anécdotas y risas.

Siempre estaré especialmente agradecida al Departamento de Genética: a Sebastián, Jesús, Mari Cruz y por supuesto a Alfonso, Fernando, Macarena, Juanjo, Reyes, Douglas, Iñaki,

Lola, Antonio, Gonzalo y Olga, gracias por vuestra paciencia y por recibirme siempre con una sonrisa, me encanta saber que estáis ahí.

Al club CEBRAS, gracias por permitirme usar el baloncesto como excusa para que los jueves se convirtieran en un gran día. Gracias equipo negro y gracias, equipo blanco.

“¡Ésta soy yo asustada y decidida!” Claudia, Cidgem, Karin... El 2007 es para mí un año inolvidable gracias a vosotras. Como bien dice Claudia, el destino nos reunió en el momento adecuado, para que nos apoyáramos las unas a las otras y para que surgiera esta amistad. Gracias por enseñarme que no existen fronteras y el valor de la “mujer brava”. Siempre os llevo conmigo.

Gracias, Eloy, por empezar siendo el chico serio y convertirte en el amigo al que perseguir por el mundo... Gracias por ser mi hermano mayor en la ciencia por preocuparte por mi futuro y por mí en general. Gracias por tomarte tan en serio tu profesión y por ser tan buen amigo de tus amigos...

Gracias Gloria, por ser como eres, por compartir conmigo tantos momentos inolvidables por reírte de mis malas anécdotas, por las charlas, por los almuerzos, por enseñarme a ser práctica en la vida sin dejar de reír, me siento afortunada por contarte entre mis amigos.

Fabi, qué te digo a ti que ya no sepas. En estos últimos años he tenido el gran privilegio de conocerte y eso ha sido fantástico. Gracias por los momentos de escalera, por enseñarme a perder el sentido del ridículo, por escucharme en mayúsculas, por apoyarme, por darme el toque de atención y darme un abrazo cuando lo necesito... Gracias por tu amistad, y gracias por enseñarme un poco de ti a través de tus niñas y tu familia. No sabes cuánto he aprendido de vosotros...

Javi, qué decir a mi llavero preferido... Gracias por darte cuenta de los momentos en los que ando sumergida en las tinieblas y de encontrar la manera de hacerme reír, por escucharme cuando ando desbocada, por ser compañero no sólo en las discusiones científicas y por esa risa fantástica que se abre camino entre placas y tubitos, para hacer que el laboratorio se convierta en un mundo lleno de posibilidades. Por tu amistad, gracias.

Gracias, a mi director de tesis, Manolo. Por brindarme la oportunidad de comenzar este camino. Por ser mi guía y por motivarme día a día. Por convertir una tarde de charla en un fantástico debate sobre las posibilidades de las proteínas p24. Por despertar mi curiosidad que

andaba adormecida. Por confiar en mí aún cuando mi confianza se quebraba. Por descubrirme una ciencia viva y apasionante. Y sobre todo, gracias por ser no sólo director sino también amigo.

Gracias también, al grupo de Howard Riezman por acogerme y mostrarme lo internacional que es la ciencia. Gracias por hacer de mi estancia un agradable recuerdo.

A Julio, Iris, Ana... Mis compañeros en Arrayán nº 9, gracias por entender cuando llego agotada y darme el espacio que necesito.

Tampoco quisiera olvidarme de mis compañeros de facultad que me regalaron el entusiasmo de aprender, gracias por seguir ahí y por los años compartidos. Ni a la fauna “alamedense” y sus anexos, que siempre están ahí para convertir el fin de semana en una excusa perfecta para pasar un buen rato.

Gracias especialmente a mis niñas, a Gema, Inma, Caro, Tere, Saray, Rosy... por preocuparos por mí, por apoyarme a pesar de no entender bien mis desvaríos acerca de GPIAPs y p24 porque sé que habéis sufrido tanto como yo la escritura y el parto. GRACIAS

Y finalmente, GRACIAS a mi familia... por ser mi apoyo, mi sostén, mi raíz, por todo.

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

S. Ayala Soriano

GRACIAS

A MI FAMILIA

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	7
1. LA RUTA SECRETORA	8
1.1. Carácter bidireccional del transporte vesicular en la ruta secretora.	8
2. FUNDAMENTOS DEL TRANSPORTE VESICULAR	10
2.1. Formación de la vesícula de transporte	10
2.2. Desplazamiento, reconocimiento y fusión de la vesícula de transporte con el compartimento aceptor	12
2.3. Programación de las vesículas para la fusión	14
2.4. Clases de cubierta proteica	15
3. TRANSPORTE VESICULAR EN LAS ETAPAS INICIALES DE LA RUTA SECRETORA	17
3.1. Exportación del RE	17
3.1.1. Capacitación para el transporte: plegamiento y control de calidad	18
3.1.2. Acceso selectivo de la carga proteica a los sitios de salida del RE	19
3.1.2.1. <i>Receptores de transporte</i>	20
3.1.2.2. <i>Otros factores de exportación del RE</i>	22
3.1.3. Ensamblaje de la cubierta citosólica y formación de la vesícula COPII	22
3.1.4. Formación de los sitios de salida del RE (ERES)	24

3.2. Transporte retrógrado desde el Golgi hasta el RE.	25
3.2.1. Selección de la carga y señales de reciclaje	25
3.2.2. Biogénesis de las vesículas COPI	27
4. LA FAMILIA DE PROTEÍNAS p24	30
4.1. Relaciones filogenéticas	30
4.2. Estructura de las proteínas p24	31
4.3. Funciones del complejo p24	34
4.3.1. Función del complejo p24 en la formación de las vesículas retrógradas COPI derivadas del Golgi	35
4.3.2. Función del complejo p24 en la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a GPI	35
4.3.3. Otras posibles funciones del complejo p24	40
OBJETIVOS	43
RESULTADOS.	47
I. ARTÍCULO I: <i>The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus</i>	49
II. ARTÍCULO II: <i>Role of the yeast p24 complex in GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring lipid remodeling</i>	59
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIONES	121
BIBLIOGRAFÍA	125

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ALPS: *Amphipathic lipid-packing sensor*

AP: *Adaptor protein complex*

Arf: *ADP-ribosylation factor*

BARS: *Brefeldin A ADP-ribosylated substrate*

BoCCS: *The binding of coatomer, cargo and SNARE*

DRM: *Detergent resistant membranes*

CPY: *Carboxipeptidase Y*

ERAD: *ER-associated degradation*

ERGIC: *ER-Golgi intermediate compartment*

ERES: *Endoplasmic reticulum exit site*

GAP: *GTPase activating proteins*

GEF: *Guanine nucleotide exchange factor*

GDP: *Guanine diphosphate*

GRM: *Glo3-regulatory motif*

GTP: *Guanine triphosphate*

GPI: *Glycosylphosphatidylinositol*

NSF: *N-ethylmaleimide sensitive factor*

RE: *Retículo Endoplásmico*

SM: *Sec1/Munc18-like proteins*

SNAP: *Soluble NSF attachment protein.*

SNARE: *SNAP receptors*

TGN: *Trans-Golgi network*

UPR: *Unfolded protein response.*

INTRODUCCIÓN

Las células eucariotas están organizadas en una serie de compartimentos internos delimitados por membranas lipídicas denominados orgánulos. Cada compartimento posee una dotación de moléculas característica que le permite realizar con eficacia determinadas funciones. No obstante, los compartimentos no son entes aislados sino estructuras interdependientes que se comunican entre sí para coordinar e integrar las diferentes actividades funcionales que desarrollan. Esta comunicación se basa, fundamentalmente, en la continua transferencia de moléculas desde un compartimento a otro. Por tanto, los orgánulos se comportan como estructuras altamente dinámicas que necesitan de mecanismos de retención y reciclaje para mantener su identidad molecular.

Una parte importante del tráfico intracelular está mediada por el transporte vesicular, objeto del presente estudio. Este tipo de transporte implica la formación de estructuras membranosas vesiculares o túbulo-vesiculares de carácter efímero, que transfieren, colectivamente, a una serie de moléculas o denominadas “carga” desde un compartimento donador hasta otro receptor (1).

El transporte vesicular define las dos grandes rutas intracelulares que operan en las células eucariotas y cuyas actividades funcionales son esenciales para la fisiología celular: la vía endocítica y la vía exocítica o secretora. Ambas rutas son complementarias ya que median la internalización y la secreción de moléculas respectivamente. El transporte vesicular no sólo mantiene la identidad estructural y funcional de los orgánulos membranosos de cada ruta sino que también garantiza su actuación conjunta. Con ello, consigue mantener la homeostasis celular y asegurar la comunicación de la célula con su entorno regulando tanto la presencia de proteínas y lípidos en la membrana plasmática como el vertido de moléculas al espacio exterior (1). El transporte vesicular no solo es relevante para la célula sino también para la fisiología del propio organismo. De hecho, mutaciones en los componentes de la maquinaria que sustenta el transporte vesicular dan lugar a numerosas enfermedades humanas (2). Significativamente, la mayor parte de estas mutaciones son sólo parcialmente defectuosas, ya que una pérdida total de la función conlleva la letalidad embrionaria (3). Por tanto, la comprensión de los mecanismos moleculares que sustentan el transporte vesicular es un tema central en el campo de la Biología Celular. En este sentido, uno de los desafíos actuales es identificar las moléculas claves que llevan a cabo los numerosos eventos de transporte vesicular y entender como éstas integran sus actividades para generar y mantener la arquitectura funcional del sistema de endomembranas de la célula.

1. LA RUTA SECRETORA

La ruta secretora es una vía biosintética que parte del retículo endoplásmico (RE) y, a través del aparato de Golgi, alcanza la membrana plasmática. En sentido estricto es el itinerario intracelular seguido por las proteínas de secreción. Sin embargo, este trayecto, o al menos parte del mismo, es también compartido por otras moléculas sintetizadas en el RE, como las proteínas y lípidos que forman parte integral de la membrana plasmática y de los propios orgánulos exocíticos y endocíticos (4).

Las proteínas que ingresan en la ruta secretora son sintetizadas por los ribosomas asociados al RE. En este orgánulo, tiene lugar el plegamiento de la proteína translocada y el establecimiento de asociaciones oligoméricas. También en el RE se producen las primeras modificaciones post-traduccionales como la N-glicosilación, la hidroxilación de residuos de prolina o la adición de glicolípidos. Durante estas reacciones las moléculas son continuamente evaluadas por un sistema de control de calidad a cargo de chaperonas y enzimas de glicosilación que determinan el momento en que aquellas alcanzan un estado conformacional apropiado (5). Posteriormente, son incorporadas en vesículas de transporte y exportadas hacia el Golgi.

En el aparato de Golgi, las proteínas recorren las sucesivas cisternas *cis*, *media* y *trans* de este orgánulo, siendo a su vez ampliamente modificadas de manera secuencial mediante la elaboración de estructuras carbohidratadas complejas y, en ciertos casos, fosforilación, sulfatación y proteólisis. Una vez alcanzan el subcompartimento más distal o TGN las proteínas son seleccionadas y enviadas en intermediarios de transporte vesiculares hacia su lugar final de residencia, bien sea el espacio extracelular, membrana plasmática, endosomas o los gránulos de secreción (6, 7).

1.1. Carácter bidireccional del transporte vesicular en la ruta secretora.

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

célula. Para preservar la identidad molecular de los orgánulos exocíticos se utilizan diferentes mecanismos que retienen a las moléculas en sus orgánulos de residencia. En muchos casos las moléculas evitan ser selectivamente incorporadas en las vesículas que median el transporte hacia otros orgánulos gracias a la carencia de señales de exportación. También la asociación física entre las propias moléculas endógenas de un orgánulo puede prevenir la salida de este. No obstante, estos mecanismos no son suficientemente eficaces por lo que las moléculas terminan escapándose a otros orgánulos situados más adelante en la ruta secretora. En este caso la célula emplea un sistema de reciclaje por el cual las moléculas escapadas son incorporadas en vesículas de transporte que las devuelven a sus orgánulos de residencia. Este tipo de transporte vesicular se conoce con el nombre de transporte retrógrado en contraposición al transporte anterógrado que lleva a cabo el avance de de las proteínas de secreción por la ruta exocítica. El transporte retrógrado no sólo ayuda a devolver aquellas proteínas que han escapado de su orgánulo de residencia, sino que también recicla los factores de transporte requeridos para futuras rondas del tráfico anterógrado. Esto hace que ambos tipos de transporte sean completamente interdependientes. Por tanto, el transporte vesicular que se establece entre los diferentes compartimentos de la ruta secretora posee una naturaleza marcadamente bidireccional, la cual es esencial para el correcto funcionamiento de la propia ruta (Figura 1) (4)

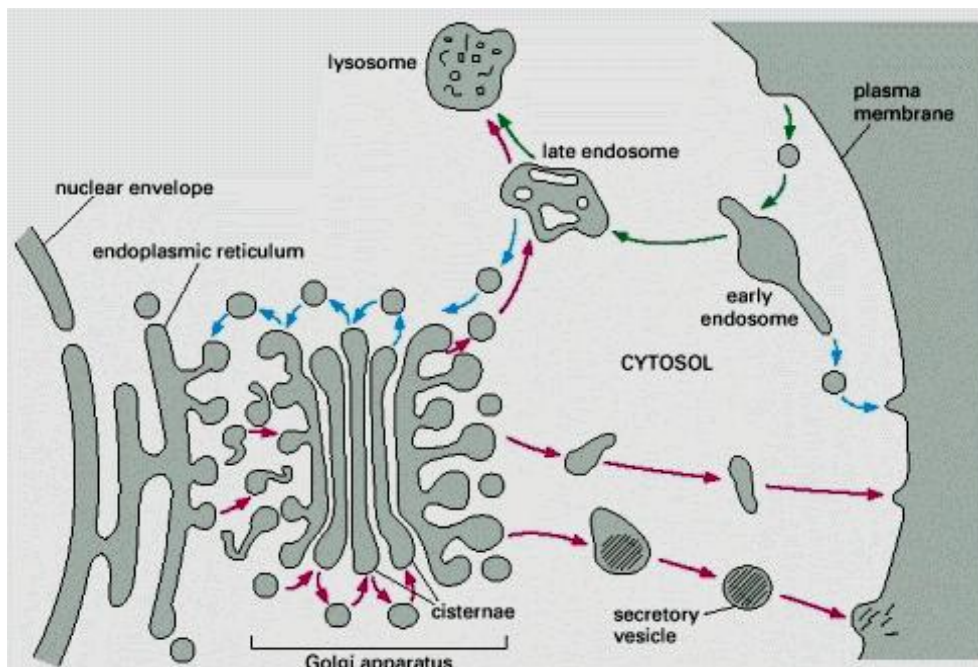


Figura 1. Carácter bidireccional del transporte vesicular entre los diferentes orgánulos exocíticos y endocíticos. Flechas rojas: transporte anterógrado. Flechas azules: Transporte retrógrado. Flechas verdes: Transporte endocítico

2. FUNDAMENTOS DEL TRANSPORTE VESICULAR

El transporte de moléculas mediado por vesículas lipídicas entre los diferentes orgánulos de la ruta secretora es un proceso extraordinariamente complejo del cual quedan todavía muchos aspectos por esclarecer. Este proceso implica la participación de diferentes tipos de moléculas que se conocen en su conjunto con el nombre de maquinaria de transporte. El ciclo de vida de una vesícula de transporte se puede esquematizar en las siguientes fases: formación, desplazamiento, reconocimiento y fusión con la membrana del orgánulo aceptor (1).

2.1. Formación de la vesícula de transporte

La biogénesis de una vesícula comprende a su vez dos procesos secuenciales: evaginación o generación de la gema mediante la deformación de la membrana del compartimento donador y escisión o liberación de la vesícula de transporte.

El proceso de evaginación tiene lugar cuando una serie de complejos proteicos citosólicos, denominados genéricamente proteínas de cubierta, se asocian a la membrana del orgánulo donador y la curvan mecánicamente hacia el citosol formando una gema. De manera simultánea, las proteínas de cubierta también seleccionan la carga proteica que debe incorporar la vesícula para que sea funcional, interaccionando con señales específicas presentes en los dominios citosólicos de las proteínas carga. Así, acoplado la captura selectiva de la carga al proceso de evaginación en la membrana donadora correcta, las proteínas de cubierta contribuyen al direccionamiento y fidelidad del transporte vesicular a lo largo de la ruta secretora (1).

Las cubiertas proteicas son estructuras dinámicas compuestas por una capa externa y otra interna. El ensamblaje de la capa externa crea una especie de jaula esférica que esculpe la membrana y da forma a la vesícula de transporte. La capa interna actúa como un adaptador que acopla la capa externa a las membranas celulares, mediante el reconocimiento específico de factores proteicos de la propia maquinaria de transporte, de moléculas carga o de lípidos de membrana cargados negativamente. Además de ejercer como puente, la capa interna también regula el propio ensamblaje de la capa externa de la cubierta determinando el tamaño de las jaulas (8, 9).

El modelo más aceptado actualmente para explicar el proceso de evaginación de una vesícula de transporte propone que una GTPasa pequeña es atraída desde el citoplasma a la membrana del orgánulo donador, donde posteriormente es activada por un factor intercambiador de nucleótidos (GEF). La GTPasa en su estado activo de unión a GTP recluta a su vez a las proteínas de cubierta, las cuales, forman un complejo cebador con una proteína estimuladora de la actividad GTPásica (GAP) y una determinada proteína carga transmembrana. La propia formación del complejo cebador activa a la proteína GAP quien a su vez estimula a la GTPasa, la cual al hidrolizar su GTP pasa a un estado inactivo. Ello conlleva que la GTPasa se desprege de la membrana y pase de nuevo al citosol. No obstante, las proteínas de cubierta y la proteína GAP continúan asociadas a la membrana a través de su unión a la proteína carga transmembrana. Por tanto, la presencia de estas proteínas carga específicas estabilizaría al complejo cebador en la membrana, lo que a su vez favorecerá el reclutamiento de otras proteínas carga adicionales. Cuando el número de complejos cebadores supera un determinado umbral (es decir, cuando hay suficiente proteína carga) estos comienzan a asociarse lateralmente entre sí formando una cubierta proteica cada vez más extensa sobre la membrana del orgánulo donador. La polimerización progresiva de la cubierta conduce a la deformación mecánica de la membrana y consecuentemente, a la generación de una vesícula de transporte (10).

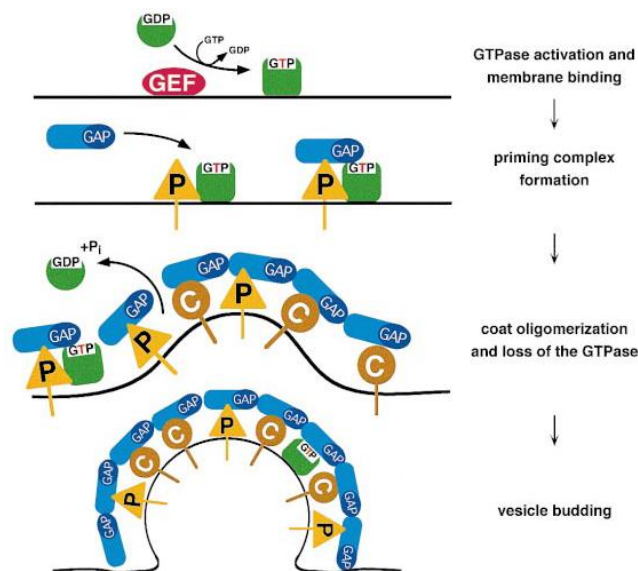


Figura 2. Representación esquemática de la formación de una vesícula de transporte. Figura verde: GTPasa pequeña, Figura roja: proteína GEF, Figura azul claro: proteínas de cubierta, Figura azul oscuro: proteína GAP, Figura amarilla (P): proteína transmembrana específica que forma y estabiliza al complejo cebador y Figura naranja (C): proteína carga transmembrana capturada por el complejo cebador una vez estabilizado (10).

Uno de los aspectos más novedosos y relevantes de este modelo es que las proteínas transmembrana, en vez de ser consideradas sólo una carga a transportar como hacía el modelo tradicional (4), desempeñarían un papel activo en el proceso de evaginación promoviendo la formación y estabilización de los complejos cebadores en la membrana del orgánulo donador. Este mecanismo aseguraría que sólo se forman vesículas de transporte cuando haya suficiente carga para transportar. De hecho, en ausencia de proteínas carga transmembrana, la inactivación de la GTPasa conllevaría la rápida disociación de las proteínas de cubierta de la membrana impidiendo la formación de la vesícula. Dado que las evidencias experimentales que apoyan este modelo han sido obtenidas usando sistemas *in vitro* de proteoliposomas sintéticos completamente artificiales, se hace necesario contrastarlas con la realización de experimentos en condiciones más fisiológicas.

Otra consecuencia importante de este modelo es que la cubierta proteica no se pierde tras la formación de la vesícula ya que ésta quedaría unida a la membrana debido a su interacción con las moléculas carga. Esto explica porqué es posible experimentalmente aislar vesículas revestidas en presencia de GTP hidrolizable. Como se comentará más adelante, la conservación de la cubierta es también consistente con la nueva función que se le ha atribuido a ésta en el proceso de reconocimiento del compartimento receptor (11).

Una vez que se ha curvado la membrana y generado una gema como resultado de la polimerización o ensamblaje de la cubierta, tiene lugar la escisión o liberación de la vesícula naciente. Se trata de un proceso bastante complejo y todavía mal comprendido, en el que cada tipo de vesícula de transporte parece utilizar una maquinaria específica para ello. No obstante, estudios recientes sugieren que las propias GTPasas pequeñas también juegan un importante papel a la hora de producir la fisión en el cuello de la vesícula naciente (12).

2.2. Desplazamiento, reconocimiento y fusión de la vesícula de transporte con el compartimento aceptor

Tras su liberación del compartimento donador la vesícula de transporte se desplaza hasta alcanzar al compartimento aceptor. Este desplazamiento puede realizarse bien pasivamente por difusión o bien activamente mediante la actuación de proteínas motoras que usan los filamentos citoesqueléticos como guías para alcanzar el destino adecuado. La importancia del papel desempeñado por el citoesqueleto y las proteínas motoras en el traslado

de las vesículas varía enormemente entre los diferentes pasos de transporte de la ruta secretora y los propios organismos (13, 14)

La interacción de la vesícula de transporte con el compartimento aceptor es un proceso gradual que consta de diferentes etapas: reconocimiento inicial, aproximación, anclaje y fusión. Cada una de estas fases es llevada a cabo por una maquinaria proteica particular. Los factores de reconocimiento inicial y aproximación (*tethering*) suelen ser proteínas citosólicas con largas porciones helicoidales (*coiled-coil*) o grandes complejos heteroméricos. Estas moléculas dan lugar a conexiones filamentosas que actúan concentrando las vesículas en las proximidades de dominios concretos de la membrana diana, donde posteriormente se producirá la fusión. El reclutamiento a la membrana de estos factores de *tethering* está regulado por las GTPasas pequeñas de la familia RAB (11, 15). Estudios recientes sugieren que los factores de *tethering* reconocen a las vesículas a través de su interacción con las proteínas de cubierta. De esta forma, se aseguraría el reconocimiento de la vesícula correcta. También se ha propuesto que cuando la vesícula ya ha contactado con el compartimento aceptor, son los propios factores de *tethering* los que dispararían el desensamblaje último de la cubierta, requisito previo para que la vesícula se ancle firmemente al compartimento aceptor y pueda fusionarse con él.

El proceso de anclaje y fusión de la vesícula con el compartimento aceptor está mediado por el emparejamiento de las proteínas transmembrana SNARE a través de sus característicos dominios citosólicos *coiled-coil*. En principio se necesitan combinaciones específicas de cuatro proteínas SNARE para consumar la fusión: una SNARE estaría integrada en la membrana de la vesícula (v-SNARE) y las otras tres pertenecerían al orgánulo aceptor (t-SNARE). La energía liberada cuando se produce el emparejamiento es utilizada para fusionar las bicapas lipídicas, entregándose con ello la carga en el compartimento adecuado (1). Aunque son piezas claves en este proceso también se conoce la existencia de otros factores necesarios tanto para la liberación de las SNARE (NSF y SNAP), como para la unión de las membranas (SM) (16). Inicialmente se pensaba que la especificidad del reconocimiento en cada paso de la ruta de transporte era aportada exclusivamente por el emparejamiento específico de las SNARE. Sin embargo, cada vez más se señala la colaboración entre los factores de *tethering*, las cubiertas de las vesículas y las propias SNARE como el verdadero elemento clave del direccionamiento en el transporte (11, 15, 16).

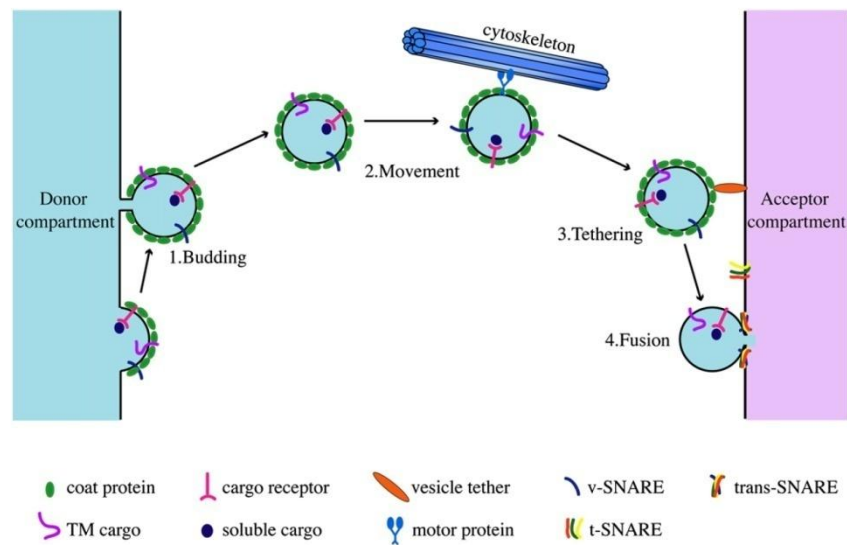


Figura 3. Ciclo de vida de una vesícula de transporte (11).

2.3. Programación de las vesículas para la fusión

Uno de los dogmas centrales del transporte vesicular es que se trata de un proceso vectorial; la vesícula de transporte generada por un compartimento donador solo podrá fusionarse con el compartimento aceptor adecuado. Dada la importancia de las SNAREs en este proceso, se ha postulado que estas proteínas podrían promover por sí mismas la formación de las vesículas que las van a transportar hasta el compartimento aceptor. Programando las vesículas de esta forma, se acoplarían los procesos de evaginación y fusión. De hecho, la observación de que las proteínas SNARE son capaces de unir eficientemente GTPasas pequeñas apoya este modelo de la programación de la vesícula, al sugerir que las SNAREs podrían nuclear el ensamblaje de la cubierta en la membrana del compartimento donador, favoreciendo la formación de vesículas que las incluyeran a ellas mismas. Además, hay datos que apuntan a que las proteínas de cubierta solo interactuarían con aquellas combinaciones de SNAREs que fueran realmente funcionales o fusogénicas (4).

Aparte de las SNAREs, otras proteínas clave para el reconocimiento del compartimento aceptor podrían también programar la vesícula para el proceso de fusión. En este sentido, se ha observado que algunos complejos de *tethering* son incorporados a la vesícula naciente a través de su unión con la cubierta y que este reclutamiento se encuentra regulado por las proteínas RAB. El hecho de que las proteínas RAB también interactúen selectivamente con las

SNAREs sugiere que todos los factores necesarios para los eventos finales de reconocimiento y fusión estarían presentes desde el inicio del transporte vesicular aunque actúen posteriormente (4).

2.4. Clases de cubierta proteica

Aunque las bases mecánicas del transporte vesicular están conservadas, distintos tipos de proteínas de cubierta funcionan en cada etapa de la ruta secretora: La clatrina y varios de sus adaptadores funcionan en etapas específicas del transporte entre el TGN, endosomas, lisosomas/vacuolas, y la membrana plasmática. Por otro lado, el complejo COPI funciona en el transporte retrógrado entre el Golgi y el RE y en el transporte intra-Golgi. Por último, la cubierta COPII media el envío de las proteínas carga desde el RE hasta el Golgi (Figura 3). A su vez cada tipo de cubierta define el resto de componentes de la maquinaria de transporte asociada a cada paso de transporte concreto; desde las GTPasas, GEF y GAP, implicadas en la evaginación hasta los factores de *tethering*, Rabs y SNAREs necesarios para el reconocimiento y la fusión. En la tabla 1 se muestran algunos de los principales componentes de la maquinaria de transporte que actúa en las primeras etapas de la ruta secretora.

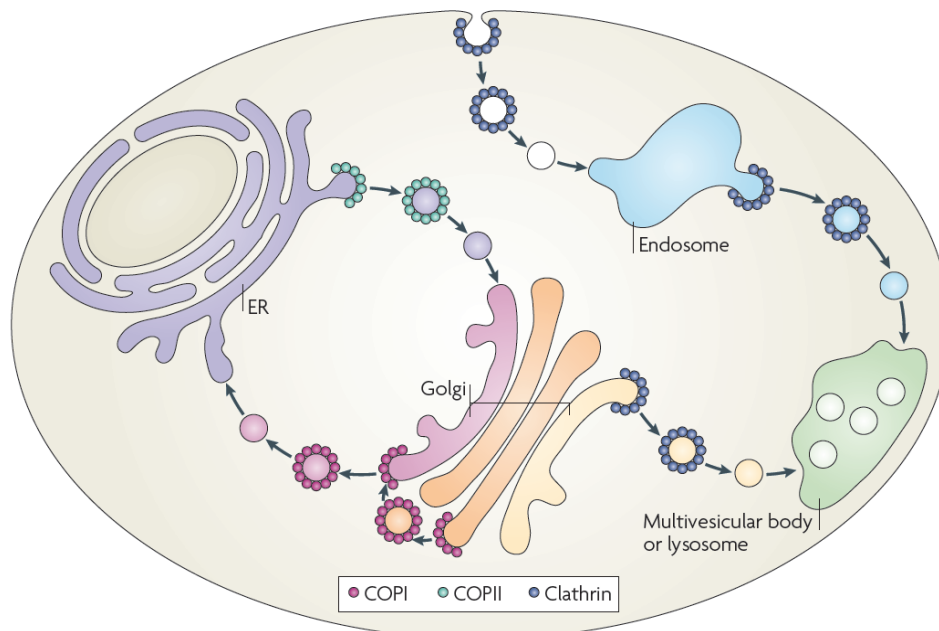


Figura 3. Clases de cubiertas proteicas (17).

Componente de la vesícula	COPI		COPII	
	Mamíferos	Levadura	Mamíferos	Levadura
GTPasa	ARF1	yARF1/2/3	hSar1p	Sar1p
GEF	GBF1, proteínas con el dominio Sec7	Gea1p/Gea2p/Sec7p	hSec12p	Sec12p
GAP	ARFGAP1/2/3	Gcs1p/Glo3p Age1/Age2	hSec23	Sec23p
Complejos de cubierta	Coatómero: α-COP β'-COP ε-COP γ-COP δ-COP β-COP ζ-COP	Coatómero: Ret1p Sec27p Sec28p Sec21p Ret2p Sec26p Ret3p	hSec23-hSec24 hSec13-hSec31	Sec23p-Sec24p Sec13p-sec31p

Tabla 1. Algunos componentes de la maquinaria vesicular que actúa en las etapas tempranas de la ruta secretora en mamíferos y en levadura (18, 19).

3. TRANSPORTE VESICULAR EN LAS ETAPAS INICIALES DE LA RUTA SECRETORA.

La naturaleza bidireccional del transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi es esencial para el correcto funcionamiento de la ruta secretora. Mientras el transporte anterógrado permite la salida de las proteínas de secreción desde el RE hacia sus destinos funcionales, el transporte retrógrado mantiene los niveles requeridos de proteínas endógenas en el retículo, evita que proteínas mal plegadas avancen por la ruta secretora y recicla los factores necesarios para futuras rondas de transporte anterógrado (4). Como se ha comentado en el apartado anterior, el establecimiento del flujo bidireccional al comienzo de la ruta secretora depende de las proteínas de cubierta COPII y COPI, las cuales participan en la generación de las vesículas mediadoras del transporte anterógrado y retrógrado respectivamente. La incorporación eficiente de las proteínas de secreción durante su exportación del RE en las vesículas COPII y de las proteínas que deben ser devueltas al RE desde el Golgi en las vesículas COPI, así como la propia formación de estos intermediarios de transporte, se halla regulada por mecanismos que aún no han sido completamente establecidos.

3.1. Exportación del RE

La ruta secretora debe transportar hasta sus destinos finales una enorme cantidad y variedad de moléculas. De hecho, estimaciones basadas en estudios genómicos y proteómicos indican que hasta un tercio de las proteínas traducidas en los genomas eucariotas ingresan en la ruta secretora (20). Este numeroso grupo de proteínas comprende moléculas con estructuras tan diferentes como proteínas solubles, proteínas unidas a la membrana a través de glicolípidos o proteínas integrales de uno o múltiples dominios transmembrana. Además, sus tamaños son también muy heterogéneos oscilando entre 2nm y 300nm (21). Aunque parte de estas proteínas que ingresan en la ruta secretora se quedan en el RE como moléculas residentes, la mayoría se exporta de este orgánulo en vesículas COPII para alcanzar, posteriormente, su destino final en la membrana plasmática o en los distintos orgánulos exocíticos y endocíticos. Por tanto, las vesículas COPII deben de ser capaces de acomodar y adaptar una extraordinaria diversidad de proteínas carga. Ello implica probablemente, la existencia de múltiples mecanismos de exportación que acoplen cada tipo de carga a la formación de las vesículas COPII y también plantea el fascinante interrogante de si cada grupo de proteínas carga es transportado en una vesícula COPII específica.

3.1.1. Capacitación para el transporte: plegamiento y control de calidad

Una de las principales funciones del RE es la producción y exportación de proteínas correctamente plegadas y oligomerizadas. Por este motivo el RE dispone de un estricto control de calidad que garantiza que sólo avancen por la ruta secretora los productos funcionales. Para ello, distintos tipos de chaperonas y enzimas monitorizan el estado de plegamiento de la proteína mediante el reconocimiento de secuencias aminoacídicas, normalmente ocultas en las cadenas polipeptídicas que están correctamente plegadas o ensambladas, grupos tiol activos, o bien el nivel de glicosilación de las proteínas (5, 22). Si la proteína no consigue, tras repetidos intentos, plegarse o ensamblarse correctamente actúa un mecanismo de degradación asociado al RE denominado *ER associated degradation* o ERAD. La proteína mal plegada es entonces de nuevo desplegada para ser retrotranslocada al citosol donde es desglicosilada, ubiquitinizada y degradada finalmente por el proteasoma (23, 24).

Cuando se acumulan demasiadas proteínas mal plegadas en el RE se genera un estrés que perturba gravemente la homeostasis de este orgánulo y por tanto su funcionalidad. Con el fin de disminuir la proteotoxicidad generada, la célula activa un programa de adaptación denominado respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (25). La activación de la UPR conduce a las siguientes acciones: incremento de la expresión de genes relacionados con proteínas que intervienen en el plegamiento, en la degradación y en el transporte RE-Golgi, atenuación de la traducción, eliminación mediante la autofagia de las regiones del RE, donde se acumulan las proteínas mal plegadas, y si el estrés no remite, el desencadenamiento final de la apoptosis (26). Según el organismo existen diferentes vías para activar la UPR. Quizás una de las vías más estudiadas y de mayor interés para este trabajo es la descrita inicialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, donde una proteína transmembrana del RE con actividad quinasa (Ire1p) es activada cuando hay un exceso de proteínas mal plegadas. En su estado inactivo, Ire1p se encuentra en forma monomérica unida a chaperonas. La presencia de proteínas mal plegadas hace que las chaperonas se despeguen de Ire1p y se unan a ellas con mayor afinidad. Entonces Ire1p dimeriza y se autofosforila, estimulándose la actividad endorribonucleasa de su dominio citosólico, la cual se encarga de eliminar el intrón del gen *HAC1*. El ARNm procesado se traduce en una proteína Hac1p funcional que migra al núcleo donde actúa como un factor estimulador de la transcripción de numerosos y diversos genes cuyos productos ayudarán a paliar el estrés nocivo generado en el RE por la acumulación de las proteínas mal plegadas (27).

3.1.2. Acceso selectivo de la carga proteica a los sitios de salida del RE

Una vez correctamente plegadas y ensambladas, las proteínas carga deben incorporarse en vesículas COPII para salir del RE y ser transportadas al Golgi. La formación de estas vesículas es el resultado del ensamblaje de las proteínas de cubierta COPII en zonas discretas de la membrana del retículo denominadas sitios de salida del RE o ERES (28). Algunas proteínas de secreción solubles extremadamente abundantes como la albumina y el quimotripsinógeno acceden de forma inespecífica a los ERES y terminan entrando pasivamente o por *bulk flow* en las vesículas COPII que allí se generan (29). Sin embargo, las evidencias indican que la mayor parte de las proteínas carga son selectivamente capturadas por las proteínas de cubierta COPII y activamente concentradas en los ERES antes de incorporarse en las vesículas anterógradas nacientes. Para ello, la cubierta reconoce una serie de secuencias específicas presentes en los dominios citosólicos de las proteínas carga transmembrana (30). Estas señales de exportación comprenden motivos diacídicos y dihidrofóbicos, entre otros (Tabla 2). El estado de plegamiento de la proteína influye en la presentación de las señales de exportación. Esto sugiere que la cubierta citosólica podría reconocer preferentemente a las proteínas correctamente plegadas. De hecho hay evidencias de que algunas proteínas mal plegadas son excluidas de los ERES. De la misma manera, el estado de oligomerización de la proteína también es importante para el reconocimiento por parte de la cubierta. Por ejemplo, en el caso de algunos componentes de complejos heteroméricos que carecen de señales de exportación, la oligomerización es necesaria para una salida eficiente del RE (31, 32). La oligomerización también favorece el reclutamiento de la cubierta al reunir y concentrar varias señales de exportación.

Proteínas	Función	Señales de exportación
Sys1p	Proteína de Golgi, supresor de mutantes de <i>ypt6</i>	<u>DEL</u>
Gap1p	Permeasa general de aminoácidos	<u>DID</u>
VSV-G	Glicoproteína de la envoltura de VSV	<u>YTDIE</u>
Kir2.2	Canal de potasio	<u>FCYENE</u>
Kir1.1	Canal de potasio	<u>VLSEVDETD</u>
Pm8p	Proteína de membrana regulada por feromona	<u>FF</u>
ERGIC53	Lectina	<u>FF</u>
Hp2481	Miembro de la familia p24	<u>FF</u>
Emp46p	Lectina	<u>YYM, LL</u>
Emp47p	Lectina	<u>LL</u>
Sed5p	t-SNARE de Golgi	<u>YNNSNPF, LMLME</u>
Bet1p	v-SNARE ER-Golgi	<u>LASLE</u>
GalT2	Enzima de Golgi	<u>RR</u>
GalNAcT	Enzima de Golgi	<u>RR</u>

Tabla 2. Diferentes señales de exportación reconocidas por la cubierta COPII de varias proteínas transmembranas (1)

3.1.2.1. Receptores de transporte

Las proteínas carga completamente luminales y las solubles, al no atravesar la membrana del RE, requieren la ayuda de una proteína transmembrana para poder interactuar indirectamente con la cubierta citosólica y ser así exportadas del RE. Estas proteínas transmembrana actuarían como receptores de transporte, capturando a un tipo específico de proteína carga y concentrándola en los ERES y vesículas COPII. Para ello el receptor de transporte debe reconocer al ligando por su región luminal mientras que interacciona con las proteínas de cubierta COPII a través de señales de exportación presentes en su dominios citosólicos. De esta manera se consigue acoplar la selección de la proteína carga con el ensamblaje de la cubierta y posterior formación de la vesícula COPII (Figura 4). Hasta la fecha se han podido identificar sólo algunos de los motivos reconocidos por los diferentes receptores en las proteínas carga luminales, como carbohidratos específicos (reconocidos por dominios de lectinas) y determinadas secuencias de aminoácidos (21).

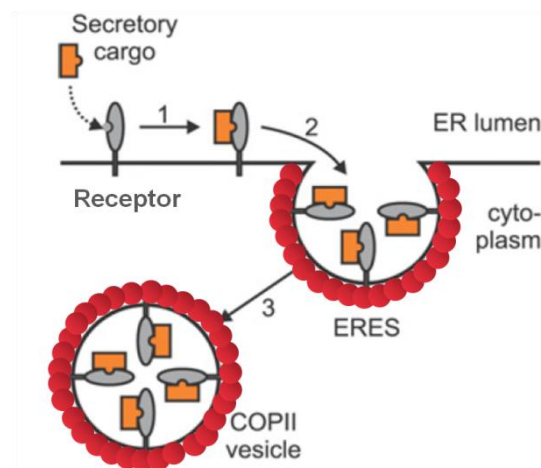


Figura 4. Modelo de actuación de un receptor de transporte

Por definición los receptores de transporte se incorporan con sus ligandos en la misma vesícula de transporte, acompañándolos hasta llegar al Golgi. Allí, tras separarse, el ligando continúa avanzando por la ruta secretora mientras que el receptor vuelve al RE utilizando el transporte retrógrado para iniciar una nueva ronda de transporte. Se ha propuesto que, en algunos casos concretos, la diferencia de pH en el lumen del RE y el Golgi es la base del mecanismo que regula la unión del ligando a su receptor. Según este modelo, el pH prácticamente neutro existente en el RE propicia la interacción ligando-receptor, mientras que el

pH más bajo del Golgi induce cambios conformacionales en el receptor que conllevan la liberación del ligando (21).

Actualmente se han identificado varios receptores de transporte aunque, lógicamente, la lista debe aumentar en el futuro. Todos ellos se caracterizan por ser proteínas muy abundantes con señales tanto de exportación del RE como de reciclaje, las cuales les permiten ciclar continuamente entre el RE y el Golgi. Además, funcionalmente los receptores se distinguen porque su carencia solo afecta al transporte específico de una determinada clase de proteínas carga. Otra característica importante es que están muy conservados en la escala evolutiva aunque en algunos organismos no se hayan identificado todavía sus ligandos o sustratos. Por último, es importante destacar que todos los receptores conocidos oligomerizan entre sí con lo que aumentan considerablemente su eficiencia de transporte. Estructuralmente hablando se distinguen dos tipos de receptores según tengan uno o múltiples dominios transmembrana. En la tabla 3 se resumen las características específicas de varios receptores de transporte anterógrado (21).

Receptor	Organismo	Proteína carga	Señal reconocida	Localización	Estado de oligomerización	Nombres alternativos	Regulación
<i>Proteínas transmembranas tipo I</i>							
ERGIC-53	Mamíferos	Factores de coagulación V y VIII, catepsinas C y Z, α 1-antitripsina	N-glicanos (mono y deglucosilados) y péptidos, β -hairpin	ERGIC, Golgi, vesículas COPI y COPII	Homodímeros y Hexámeros	Emp46p/ Emp47p (sc)	pH, Ca^{2+} , oligomerización, MCFD2
Proteínas p24	Levaduras	Gas1p (sc), Proteínas ancladas a GPI (hs)	Desconocida	ER, ERGIC, Golgi, vesículas COPI y COPII	Hetero oligómero	Tabla 5	Desconocida
<i>Proteínas transmembrana multipaso</i>							
Erv29p	Levaduras	Proteínas solubles luminales, pre-profactor, CPY, proteínasa A	I-L-V (α -factor)/ α -helice	ER, Golgi, vesículas COPII	Oligómero	Surf4 (hs)	Desconocida
Erv26p	Levaduras	Proteínas transmembrana de tipo II, ALP, Ktr3p	Secuencia luminal	ER, Golgi, vesículas COPII	Oligómero	Svp26 (sc)	Desconocida
Erv14p	Levaduras	Proteína transmembranas, Axl2p, Sma2p	Secuencia luminal	ER, Golgi, vesículas COPII	Oligómero	Cornicon (dm)	

(sc) *Saccharomyces cerevisiae*, (hs) *Homo sapiens*, (dm) *Drosophila melanogaster*

Tabla 3. Receptores de transporte anterógrado (21).

3.1.2.2. Otros factores de exportación del RE

Además de los receptores de transporte enumerados en la tabla 3 existen una serie de factores necesarios para la exportación selectiva de determinadas proteínas. A diferencia de los receptores, estos factores no suelen incorporarse en la vesícula conjuntamente con su ligando o proteína carga. En muchos casos se tratan de chaperonas específicas que ayudan a plegar correctamente un tipo particular de proteínas. Por otro lado, existen factores como la proteína integral TANGO1, que promueve la inclusión en las vesículas de las moléculas de colágeno interactuando con la cubierta COPII pero sin incorporarse ella misma en la propia vesícula (33). En otros casos, el factor de exportación abandona el RE con su ligando. Se trata de las llamadas chaperonas acompañantes, las cuales escoltan al ligando optimizando su transporte ya que lo mantienen durante el trayecto en un estado de plegamiento óptimo para ello (34, 35).

3.1.3. Ensamblaje de la cubierta citosólica y formación de la vesícula COPII

El ensamblaje de la cubierta COPII comienza cuando la GTPasa pequeña de la superfamilia Ras, Sar1, es activada. La conversión de Sar1-GDP en Sar1-GTP está mediada por el GEF Sec12. El hecho de que Sec12 sea una proteína transmembrana endógena del RE garantiza que la activación de Sar1 se vea restringida de modo específico a la membrana de este orgánulo. La transición de la forma Sar1-GDP a la forma activa, Sar1-GTP, dispara la exposición de una α -hélice anfipática N-terminal que se inserta en la bicapa lipídica del RE. Cuando esto ocurre, Sar1 recluta al heterodímero Sec23-Sec24 (capa interna de la cubierta COPII) mediante la interacción directa con Sec23. Mientras que Sec23 actúa como proteína GAP de Sar1, Sec24 es la subunidad encargada de reclutar las proteínas carga transmembrana. Para ello dispone de varios bolsillos hidrofóbicos, lo que indica que una única molécula de Sec24 puede, probablemente, unir varias proteínas carga a la vez. Además, el hecho de que existan varias isoformas de Sec24 hace pensar que cada una de ellas puede reconocer un tipo diferente de señal de exportación citosólica (36, 37).

La unión de las proteínas carga al complejo Sar1/Sec23-Sec24 da lugar a la formación de un complejo cebador, el cual recluta seguidamente, al subcomplejo heterotetramérico Sec13-Sec31 (capa externa de la cubierta COPII). El propio reclutamiento de Sec13-Sec31 estimula enormemente la actividad GAP de Sec23, lo que a su vez dispara la actividad GTPásica de Sar1. Al hidrolizar su GTP, Sar1 pasa a su forma inactiva despegándose de la membrana. En este momento, los complejos Sec23-Sec24 y Sec13-Sec31 quedarán unidos a la membrana solo

través de la interacción de Sec24 con los dominios citosólicos de las proteínas carga. Si llegado este momento hay un número suficiente de moléculas carga estabilizando complejos cebadores, los subcomplejos Sec13-31 polimerizarán, generando la fuerza necesaria para deformar la membrana y producir la evaginación. Sin embargo, en el caso de que no haya una mínima cantidad de proteínas carga transmembrana no se estabilizarán suficientes complejos cebadores por lo que la capa externa de la cubierta no polimerizará, abortándose rápidamente el proceso de evaginación (37).

Un detalle relevante de este modelo es que la continua presencia del GEF Sec12 haría que las moléculas de Sar1-GDP recién disociadas de la membrana por la acción de la GAP Sec23, se activaran de nuevo, volviendo rápidamente a la membrana y generando nuevos complejos cebadores que a su vez capturarían más proteínas carga. Por tanto, se ha propuesto que el flujo continuo de asociación y disociación de Sar1 resultante de la acción combinada de Sec12 y Sec23, promueve la concentración de proteínas carga en la vesícula naciente. Una vez incorporadas, las proteínas carga serían elementos clave para ir estabilizando los nuevos complejos cebadores (37).

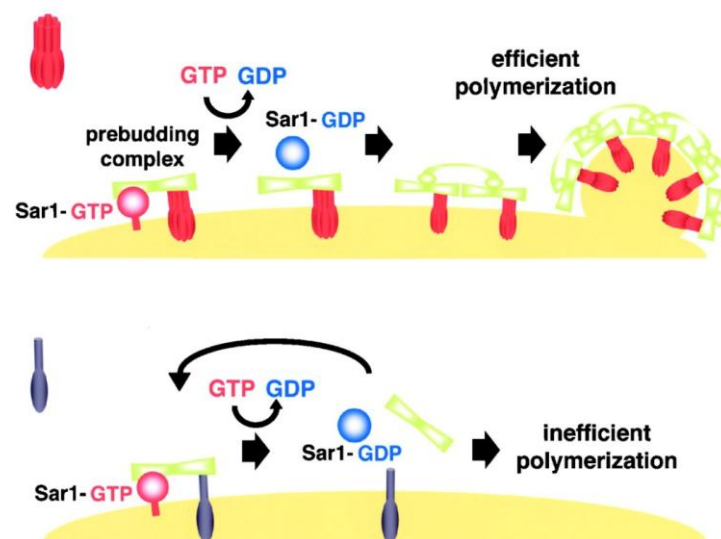


Figura 5. Formación de la vesícula COPII. Parte superior de la imagen: Fase productiva. Cuando hay suficiente número de moléculas carga correctamente ensambladas los complejos cebadores se estabilizan sobre la membrana del RE y favorecen el ensamblaje de la cubierta COPII. Parte inferior de la imagen: Fase improductiva. Si la cantidad de moléculas carga es demasiado escasa o estas no están correctamente ensambladas no se formarán ni se estabilizarán los complejos cebadores necesarios para ensamblar la cubierta COPII (38).

Tras la formación de la gema, se produce la escisión o liberación final de la vesícula COPII. Estudios recientes han implicado directamente a Sar1 en este proceso. Se ha propuesto que los continuos ciclos de unión y desunión de Sar1 en el cuello de la vesícula, promovidos por la acción combinada de Sec12 y Sec23, generan una dinámica de inserción y retracción de la hélice anfipática en la membrana que culminaría con la liberación de una vesícula de entre 50-60nm de diámetro (36).

3.1.4. Formación de los sitios de salida del RE (ERES)

Como se comentó en apartados anteriores, el ensamblaje de la cubierta COPII y el reclutamiento simultáneo de las proteínas carga, ocurre preferencialmente en zonas especializadas de la membrana del RE. En esos lugares se forman las vesículas COPII, por lo que se denominan sitios de salida del RE o ERES. Estudios *in vivo* han puesto de manifiesto que los ERES tienen una estructura altamente dinámica con una vida media de varios minutos (39, 40). Pese a su aparente importancia funcional en el proceso de exportación del RE, los mecanismos que regulan la estructura y función de los ERES se desconocen por completo.

El único elemento identificado de los ERES, a excepción de los componentes de la cubierta COPII ya mencionados, es una enorme proteína periférica citosólica de 240 kDa conocida como Sec16. Se ha demostrado que Sec16 es necesario para mantener la integridad funcional y estructural de los ERES. En este sentido, se piensa que Sec16 crea una especie de plataforma estable donde se promueve el ensamblaje de la cubierta COPII (41, 42).

Recientemente se ha demostrado que la cantidad de proteínas carga sintetizadas y la composición lipídica de la membrana del RE puede influir tanto en la organización dinámica como en el número de ERES por célula. Por tanto, la naturaleza y estructura de los ERES parecen estar estrechamente relacionados con las proteínas y lípidos que exportan. En este sentido se han identificado diferentes tipos de ERES que se caracterizan por albergar un grupo específico de moléculas cargas (43). Desde cada tipo de ERES también se generan vesículas COPII específicas conteniendo una determinada carga (44). Esto indica la existencia de un proceso de segregación de la carga durante la salida del RE, resultante de la actuación de diferentes mecanismos de exportación. Hasta el momento se han identificado sólo unas cuantas clases de ERES pero no se descarta que existan más dada la enorme diversidad estructural y funcional de las moléculas carga que transitan por la ruta secretora. En levadura se conoce la

existencia al menos tres clases de ERES que contienen diferentes proteínas carga mientras que en mamíferos han sido identificados sólo dos tipos.

3.2. Transporte retrógrado desde el Golgi hasta el RE

A pesar de su trascendencia funcional, el transporte retrogrado Golgi-RE mediado por vesículas COPI aparenta tener un menor grado de complejidad que la exportación del RE en cuanto a que las vesículas COPI no parecen generarse en zonas discretas y altamente organizadas como los ERES. No obstante, se ha propuesto que esta función de sitio privilegiado para la formación de vesículas COPI podría ser adjudicada al compartimento intermedio presente en las células de mamífero, aunque ausente en eucariotas inferiores como la levadura. A pesar de esta mayor simplicidad aparente todavía queda mucho por conocer sobre los mecanismos que gobiernan al transporte retrógrado, no solo en su misión de reciclar componentes al RE, sino también en la de mantener la estructura funcional del aparato de Golgi.

3.2.1. Selección de la carga y señales de reciclaje

Cuando la vesícula COPII procedente del RE fusiona con la membrana del Golgi no sólo entrega las moléculas carga que deben seguir avanzando por la ruta secretora o que forman parte del mismo Golgi, sino que también descarga proteínas transmembrana pertenecientes a la maquinaria de transporte anterógrado como las v-SNAREs y los receptores de transporte. Estas proteínas integrales, que se incorporan activamente en las vesículas COPII, deben reciclarse y volver al RE para poder iniciar una nueva ronda de transporte vesicular anterógrado. Por otro lado, también deben ser devueltas desde el Golgi aquellas proteínas residentes del RE que debido al intenso flujo exocítico terminan escapándose mediante transporte pasivo o *bulk flow*. Para ello, todas estas proteínas son selectivamente capturadas en el Golgi por las proteínas de cubierta COPI e incorporadas eficientemente en las vesículas de transporte retrógrado (4). La cubierta COPI reconoce directamente varias señales de reciclaje en los dominios citosólicos de las proteínas carga transmembrana. La señal di-lisina, K(X)KXX, presente en el extremo carboxilo de muchas proteínas endógenas del RE y receptores de transporte que ciclan entre el RE y el Golgi (45), es quizás la más relevante, aunque otras como el motivo formado por dos residuos de arginina, RXR o el motivo di-fenilalanina también se unen específicamente a la cubierta COPI (46, 47). Sin embargo, algunas proteínas integrales de la membrana del RE no poseen tales señales de reciclaje. Estas proteínas, entre las que se encuentra Sec12 (la proteína

GEF de la maquinaria COPII) y Sec63 (componente del translocón), son reconocidas específicamente en el Golgi por un receptor de transporte retrógrado denominado Rer1 que las devuelve al RE. Para ello, Rer1 interacciona con su ligando a través del dominio transmembrana de éste y lo empaqueta en las vesículas COPI (21).

Además de proteínas transmembrana, también se escapan al Golgi por *bulk flow* numerosas proteínas solubles endógenas del RE que deben retornar a su lugar de residencia. Sin embargo, al no tener éstas dominios citosólicos, requieren de un receptor de transporte para interactuar indirectamente con la cubierta COPI y ser incorporadas eficientemente en las vesículas retrógradas. Este papel de receptor de transporte retrógrado lo lleva a cabo Erd2, una proteína de siete dominios transmembrana estructuralmente relacionada con los receptores acoplados a proteínas G triméricas, con capacidad para unir a la cubierta por su lado citosólico y a los ligandos por su lado luminal, a través de varios bolsillos de interacción. En concreto, Erd2 reconoce una señal de cuatro aminoácidos KDEL (HDEL en levaduras) presentes en el extremo carboxilo de las proteínas solubles residentes del RE por lo que también se le conoce con el nombre de receptor de KDEL. Erd2 se localiza principalmente en el Golgi. Allí, el reconocimiento del ligando dispara la fosforilación de su tallo citosólico y la oligomerización del propio receptor permitiendo su incorporación eficiente en las vesículas COPI conjuntamente con el ligando. Una vez alcanzado el RE, el pH inferior de este orgánulo libera al ligando de su receptor, el cual vuelve vacío al Golgi incorporándose en las vesículas COPII (21).

El transporte retrógrado también juega un importante papel en el control de calidad devolviendo al RE aquellas proteínas mal plegadas y ensambladas que han escapado por *bulk flow* hasta el Golgi, evitando así su avance por la ruta secretora. Para ello, la maquinaria de reciclaje COPI detecta la presencia de estas proteínas en el Golgi y las incorpora en vesículas retrógradas COPI. Por ejemplo, algunos componentes de complejos oligoméricos son devueltos al RE si se encuentran en estado monomérico ya que poseen señales de reciclaje que solo se enmascaran en el oligómero (48). También se han descrito elementos acompañantes que se unen de modo específico al oligómero ocultando las señales de reciclaje, como el caso de las proteínas 14-3-3 que compiten con la cubierta COPI en la unión a los canales de potasio correctamente ensamblados (49). Por otro lado, las proteínas mal plegadas que han escapado y alcanzado el Golgi también son devueltas al RE en vesículas COPI al estar constantemente unidas a chaperonas residentes del RE que son reconocidas, a su vez, por el receptor de transporte retrógrado Erd2. Asimismo, se ha propuesto recientemente que Vip36 actuaría como otro receptor de transporte retrógrado reconociendo en el Golgi a las proteínas carga mal glicosiladas y retornándolas al RE (50).

Receptor	Especie	Proteína carga	Señal reconocida	Localización	Estado de oligomerización	Nombres alternativos	Regulación
Proteínas transmembranas tipo I							
VIP36	Mamíferos	α -amilasa		ERGIC, Golgi.	Desconocido		pH (pH ligeramente ácido)
Proteínas transmembrana multipaso							
Erd2p	Levaduras	Proteínas luminales con la secuencia HDEL	HDEL (levaduras), KDEL (mamíferos)	ER, ERGIC, Golgi, vesículas COPI y COPII	Oligómero	Receptor de KDEL	pH, oligomerización dependiente del ligando, fosforilación
Rer1p	Levaduras	Proteínas transmembranas, Sec12p, Sec63p, Sec72p, Mns1p.	Residuos polares del dominio transmembrana	ER, Golgi, vesículas COPII	Desconocido	Rer1 (hs)	Oligomerización de la carga.

(hs) Homo sapiens

Tabla 4. Receptores relacionados con el transporte retrógrado (21).

3.2.2. Biogénesis de las vesículas COPI

La biogénesis de las vesículas COPI es controlada por Arf1, una pequeña GTPasa de la superfamilia Ras. Al contrario que Sar1, Arf1 está implicada en la formación de vesículas en diferentes etapas de transporte a lo largo de la ruta secretora, siendo por tanto capaz de reclutar varios tipos de cubierta como COPI y clatrina. Esta multifuncionalidad se debe a que Arf1 está regulada en cada etapa de transporte por diferentes tipos de proteínas GEF y GAP (51). En concreto, las Arf-GEF que activan a Arf1 en la membrana del Golgi para generar vesículas retrógradas COPI son Gea1p y Gea2p en levaduras (52) y GBF1 en mamíferos (53). Todas ellas se caracterizan por poseer un dominio Sec7 responsable del intercambio de nucleótidos (54) y a diferencia de Sec12, la proteína GEF del sistema COPII, las Arf-GEF son proteínas citosólicas. Por ello, tanto las Arf-GEF como Arf1 necesitan elementos adicionales que las localicen en la membrana del orgánulo adecuado (55, 56). Aunque se han propuesto varias proteínas transmembrana como candidatos, como la SNARE membrana, no está del todo claro todavía cómo son reclutadas específicamente a la membrana del Golgi.

Muchos aspectos de la formación de las vesículas COPI están sometidos actualmente a un amplio debate. La evaginación en la membrana de Golgi se inicia cuando la Arf-GEF intercambia el GDP por el GTP de Arf1. Al activarse, Arf1 sufre un cambio conformacional, el cual induce la exposición de una hélice anfipática N-terminal modificada con un ácido mirístico que ancla de modo estable la proteína a la membrana. Desde la membrana, Arf1 recluta un

complejo proteico denominado coatómero constituido por 7 subunidades, β , γ , δ , ζ , α , β' , ϵ , el cual forma un complejo cebador conjuntamente con una ArfGAP y una determinada proteína transmembrana. Cuando el número de complejos cebadores supera un determinado umbral (es decir, cuando hay suficiente proteína carga) éstos comienzan a asociarse lateralmente entre sí formando una cubierta proteica cada vez más extensa sobre la membrana del orgánulo donador. La polimerización progresiva de la cubierta conduce a la deformación mecánica de la membrana y consecuentemente a la generación de una vesícula de transporte (57).

Un aspecto intrigante de este proceso es la existencia de varias ArfGAP que parecen actuar en el mismo paso de transporte retrógrado Golgi-RE pero que regulan la actividad GTPásica de Arf1 de diferente manera. En levadura estas ArfGAP son Glo3p y Gcs1p, mientras que en mamífero son ARFGAP1, ARFGAP2 y ARFGAP3. Gcs1p sería el homólogo de ARFGAP1 y Glo3p se correspondería estructuralmente y funcionalmente con ARFGAP2 y ARFGAP3 (58). El papel exacto y la importancia funcional de cada una de estas clases de ArfGAP en el proceso de formación de vesículas retrógradas COPI están todavía sin aclarar.

Se ha propuesto que ARFGAP1/Gcs1p es capaz de detectar la curvatura de la membrana gracias a un dominio especial denominado ALPS (*amphipathic lipid-packing sensor*) (59). Por tanto, ARFGAP1/Gcs1p solo se activaría cuando los complejos cebadores comienzan a deformar la membrana al ensamblarse. De esta manera en la zona curvada de la vesícula naciente, ARFGAP1/Gcs1p estimularía a Arf1 que hidrolizaría su GTP, inactivándose y volviendo al citosol. Con ello Arf1 quedaría libre para poder ser de nuevo capturado por su GEF en la parte limítrofe de la vesícula con el RE que todavía se encuentra plana e iniciar una nueva ronda de formación de complejos cebadores que al ensamblarse hará que la gema vaya creciendo. En la zona curvada, ya sin Arf1, el coatómero y ARFGAP1/Gcs1p continuarían unidos a la membrana a través de las proteínas carga (57). Aunque se trata de un modelo bastante atractivo, la monitorización de la curvatura por el dominio ALPS se basa en experimentos *in vitro* muy artificiales que algunos laboratorios no han podido reproducir. Aun así, el mayor inconveniente de este modelo es que ARFGAP1/Gcs1p parece que no interacciona con el coatómero, por lo que no podría acoplar la regulación de Arf1 a la incorporación de la propia carga proteica.

Por el contrario, Glo3 y sus homólogos de mamífero carecen del dominio ALPS pero si son capaces de unir al coatómero eficientemente. Es más, se ha comprobado que el coatómero induce enormemente la actividad GAP de Glo3p por lo que se ha postulado un mecanismo de regulación muy parecido al que tiene lugar en el sistema COPII. Una vez formado el complejo

cebador Arf1/coatómero/Glo3p/carga, la interacción coatómero-Glo3p estimula rápidamente la actividad GAP que a su vez hace que Arf1 hidrolice su GTP y se despegue ya inactivo de la membrana. La cubierta formada en este caso por el coatómero y Glo3p se mantiene unida a la membrana a través de las proteínas carga. En este sentido Glo3p ha sido caracterizada como un componente más de la cubierta COPI (57, 58).

Por último, la escisión o liberación de la vesícula COPI naciente de la membrana del Golgi es un proceso muy complejo y poco conocido, en el que parecen intervenir de forma coordinada una gran variedad de moléculas como el ácido fosfatídico, el diacilglicerol, el propio Arf1, unas proteínas denominadas BARS y la fosfolipasa D2 entre otras (57).

4. LA FAMILIA DE PROTEÍNAS p24

Los miembros de la familia p24, objeto de estudio de este trabajo, fueron inicialmente identificados como elementos muy abundantes del RE y del Golgi, así como componentes mayoritarios de las vesículas de transporte COPII y COPI. Se trata de proteínas transmembrana tipo I de aproximadamente 24KDa, con un dominio luminal que contiene motivos de unión a proteínas y un tallo citosólico que muestra una gran afinidad para interactuar con los complejos de cubierta COPII y COPI. Las proteínas p24 forman un complejo heteromérico que cicla constantemente entre el RE y el Golgi. Dado que la familia p24 está muy conservada evolutivamente desde levaduras hasta mamíferos, se piensa que el complejo p24 debe jugar un importante papel en el flujo vesicular bidireccional que tiene lugar en la interfase RE-Golgi (3). Sin embargo, a pesar de que la familia p24 se describió hace bastantes años, los mecanismos concretos por los que el complejo p24 opera al comienzo de la ruta secretora siguen siendo todavía motivo de debate y estudio.

4.1. Relaciones filogenéticas

Los análisis filogenéticos dividen a la familia p24 en 4 subfamilias: p24 α , β , γ y δ (60). El número de representantes de cada subfamilia varía entre los diferentes organismos. Así, animales y hongos poseen representantes de cada subfamilia, mientras que las plantas, sólo tienen miembros de las subfamilias p24 β y p24 δ . La familia p24 está formada por 8 miembros en la levadura, *Saccharomyces.cerevisiae* (61), 9 en *Drosophila melanogaster* (62), 11 en *Arabidopsis thaliana* (60), 10 en *Xenopus laevis* (3) y 10 en mamíferos (63). En la tabla 5 se indica la nomenclatura que reciben las proteínas p24 en diferentes organismos. De los datos filogenéticos también se desprende la existencia de dos ramas evolutivas diferentes que agrupan a las subfamilias p24 α y p24 δ por un lado, y a las subfamilias p24 β y p24 γ por otro (60). Curiosamente, en cada rama evolutiva sólo una de las subfamilias sufre una mayor diversificación (Tabla 5). Esto podría explicarse si existiera cierta redundancia funcional entre los miembros de las subfamilias de una misma rama como se ha demostrado en levaduras (61). Sin embargo esta redundancia funcional se vería limitada en los organismos pluricelulares donde una mayor complejidad necesita de una mayor especialización. De hecho, en *Xenopus laevis*, ratón (3) y *Drosophila melanogaster* (60) existe un patrón de expresión diferencial específico de tejido en el que los distintos miembros de las subfamilias no son intercambiables.

Vertebrados					
	Nombre sistemático	Nombre de la base de datos	Nombres alternativos	<i>D. melanogaster</i>	<i>S. cerevisiae</i>
α/p25	P24 α_1	TMED11	gp25L	Eclair	Erp1p
	P24 α_2	TMED9	p25, GMP25, gp25L2, p24d, p24D,		Erp5p
	P24 α_3	TMED4	GMP25iso		Erp6
δ/p23	P24 δ_1	TMED10	p23,tmp21(-I), p24c	Baiser	Erv25p
	P24 δ_2		p23iso		
β/p24	P24 β_1	TMED2	p24, p24a	CG3564 CG9308	Emp24p
γ/p26	P24 γ_1	TMED1	tp24, T1/ST2 ¹	CG1967	Erp2p
	P24 γ_2	TMED5	p28, T1/ST2 iso ²	CG31787	Erp3p
	P24 γ_3	TMED7	(g)p27	CG9053	Erp4p
	P24 γ_4	TMED3	p26, p24b	Logjam	
	P24 γ_5	TMED6			

¹ p24 γ_1 es nombrado en la bibliografía, erróneamente, como T1/ST2 en vez del nombre original: “T1/ST2 receptor binding protein”

² También por confusión y por la similitud entre p24 γ_1 y p24 γ_2 , éste es llamado T1/ST2 iso.

Tabla 5. Nomenclatura de las p24 en vertebrados, *D. melanogaster* y *S. cerevisiae* (3).

4.2. Estructura de la proteínas p24

La topología tipo I de las proteínas p24 incluye un único dominio transmembrana que conecta una larga región luminal N-terminal con una secuencia citosólica C-terminal relativamente corta de 12 a 20 aminoácidos.

En la región luminal se encuentran la secuencia señal necesaria para su ingreso en el RE, un dominio GOLD (*Golgi dynamics*) y una región *coiled-coil* (Figura 6A). El dominio GOLD llamado así por haberse encontrado en proteínas que funcionan en la dinámica del Golgi, posee dos cisteínas altamente conservadas que presuntamente generan un puente disulfuro. Se postula que forma una estructura compacta donde dos láminas β se apilan una sobre otra a modo de sándwich. Las asas que conectan las hebras β de la estructura son muy variables lo que podría

favorecer la creación de dominios específicos involucrados en procesos de interacción con otras moléculas (64). La región *coiled-coil*, que precede a la región transmembrana, es un dominio involucrado en la formación de complejos proteicos. De hecho se piensa que es la región por donde se unen las propias proteínas p24 entre sí para formar complejos heteroméricos (heterodímeros o tetrámeros) constituidos por, al menos, un miembro de cada subfamilia (Figura 6B) (61, 65).

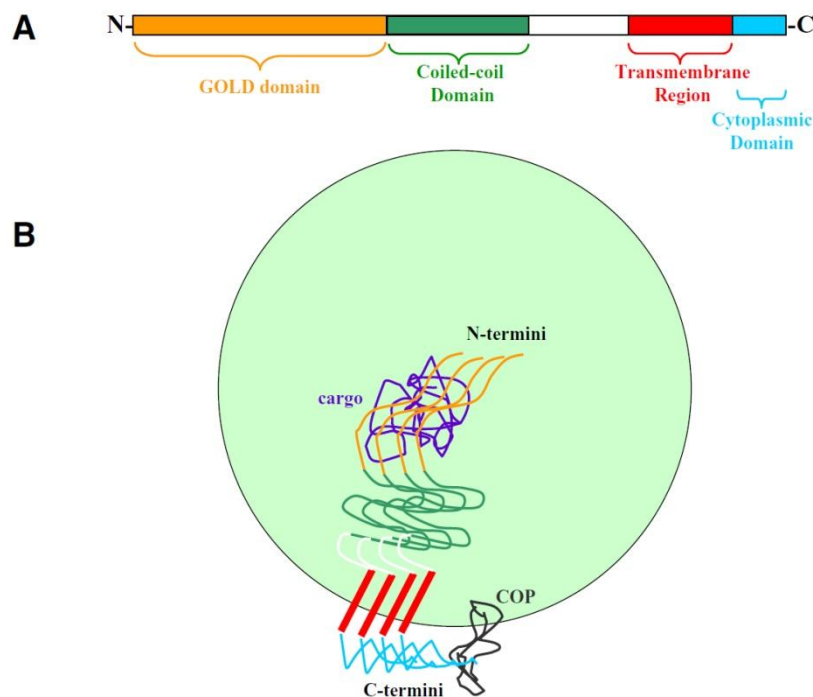


Figura 6. Esquema de la organización estructural de las proteínas de la familia p24. A) Estructura de las proteínas p24 destacándose el dominio GOLD, la región coil-coiled, un dominio transmembrana y la cola/tallo citosólica. B) Representación esquemática del complejo p24 en la célula (60).

La oligomerización del complejo p24 es esencial para la estabilidad de las propias proteínas p24 en la célula así como para su transporte entre RE y Golgi (61, 65) y el desarrollo de sus funciones. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* el complejo está formado principalmente por las proteínas Emp24p, Erv25p, Erp1p y Erp2p. La eliminación tanto de Emp24p como de Erv25p genera complejos inestables no funcionales que terminan siendo degradados, de modo que la eliminación de uno de los miembros de la familia tiene como consecuencia la disminución de los niveles proteicos del resto de la familia como se aprecia en la figura 7 (61, 66). Un proceso similar ha sido descrito en mamíferos, donde el descenso de la

expresión de uno de los genes de la subfamilia p24 δ disminuye los niveles proteicos de otros miembros de la subfamilia p24 α (67).

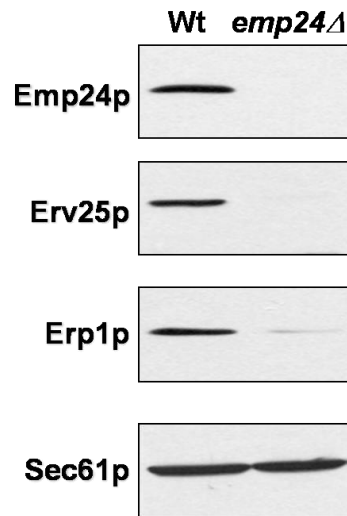


Figura 7. Los niveles proteicos de los miembros de la familia p24 son interdependientes.

En un mutante de levadura que carece del gen *EMP24*, *emp24 Δ* , los niveles de proteínas de otros miembros de la familia como Erv25p y Erp1p disminuyen drásticamente.

Aunque el tallo citosólico representa sólo un pequeño porcentaje de la proteína, de 12 a 20 residuos, es en esta región donde se localizan las señales responsables del movimiento cíclico y de la localización del complejo p24 en la célula. En esta porción se sitúan dos tipos de motivos: los di-aromáticos/di-hidrofóbicos, involucrados en la interacción con las cubiertas COPI y COPII; y el dominio di-básico, exclusivo de la unión a cubiertas COPI (Figura 8). En la tabla 6 se han representado las regiones C-terminales de distintos miembros de la familia p24 tanto de mamíferos como de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, resaltándose los motivos implicados en los procesos de interacción.

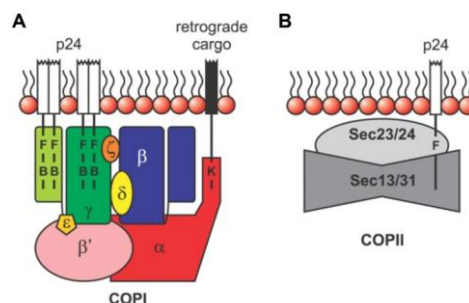


Figura 8. Representación esquemática de la interacción entre los tallos citosólicos de la familia p24 y las cubiertas COPI (A) y COPII (B) (3).

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

Tabla 6. Secuencias de las regiones citosólicas de cuatro miembros de la familia p24 en ratón y en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se han destacado los motivos de carácter hidrofóbico en naranja y en azul los básicos (63, 68).

4.3. Funciones del complejo p24

En base a las evidencias experimentales existentes se ha propuesto que el complejo p24, utilizando su movimiento cíclico entre el RE y el Golgi, estaría principalmente implicado tanto en el transporte retrógrado, promoviendo la formación de vesículas COPI derivadas del Golgi, como en el transporte anterógrado, facilitando la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI). No obstante, el papel exacto que desempeña el complejo p24 en estos procesos sigue sin estar claramente definido. Por esta razón, decidimos realizar un análisis funcional en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que nos permitiera diseccionar molecularmente el mecanismo de actuación del complejo p24 al comienzo de la ruta secretora.

4.3.1. Función del complejo p24 en la formación de vesículas retrógradas COPI derivadas del Golgi

Como se ha comentado en apartados anteriores, los modelos actuales que tratan de explicar el proceso de formación de la vesícula COPI confieren un papel esencial a determinadas proteínas carga transmembrana al promover la estabilización de los complejos cebadores en la membrana del Golgi. Se ha sugerido que las proteínas p24 podrían llevar a cabo esta función estructural, al ser pasajeros mayoritarios de las vesículas COPI y mostrar una gran afinidad de unión por el coatómero (47, 69). La principal evidencia que apoya esta idea proviene de un estudio *in vitro* en el que se comprobó como los tallos citosólicos de las proteínas p24 de mamífero dispuestos sobre la superficie de liposomas sintéticos son capaces de estimular la formación de vesículas COPI (70). Además, los datos obtenidos por varios estudios estructurales realizados también sobre las proteínas p24 de mamífero, sugieren que el complejo p24 podría promover el ensamblaje de la cubierta COPI en la membrana del Golgi a través de diferentes mecanismos: Induciendo cambios conformacionales en los componentes del coatómero que favorecerían la oligomeración del mismo, regulando la actividad de la ArfGAP para estabilizar al complejo cebador, y atrayendo específicamente a Arf1-GDP a la membrana del Golgi para ser posteriormente activada por su proteína GEF (71-73).

Si el complejo p24 es realmente necesario para la biogénesis de las vesículas COPI, sería esperable que también fuera esencial para la fisiología celular dada la importancia que para la propia célula tiene el transporte vesicular mediado por la cubierta COPI. Sin embargo, un trabajo realizado en levadura contradice claramente esta hipótesis. En efecto, la eliminación de todos los miembros de la familia p24 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no produce ningún fenotipo severo en el transporte intracelular ni genera importantes alteraciones morfológicas en el sistema de endomembranas, lo que sugiere que el complejo p24 podría no ser importante para la función COPI (74). Por tanto, la cuestión de si las proteínas p24 están realmente involucradas en la formación de las vesículas COPI o si por el contrario son meros pasajeros se encuentra actualmente abierta al debate.

4.3.2. Función del complejo p24 en la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a GPI

Las proteínas ancladas a GPI son un grupo particular de proteínas de secreción que se encuentran unidas a la cara externa de la membrana plasmática de las células eucariotas a través

de su glicolípido (Figura 9A). Allí llevan a cabo una gran diversidad de funciones fisiológicas. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* son elementos importantes en la biogénesis y ensamblaje de la pared celular, siendo esenciales para su viabilidad (75, 76). En mamíferos, las proteínas ancladas a GPI están relacionadas con importantes procesos celulares como, interacción célula-célula, mecanismos de transducción de señales, adhesión celular y defensa inmunológica (77). Aunque en los cultivos celulares no son esenciales, las proteínas ancladas a GPI son vitales para el desarrollo embrionario (76). Además, tienen especial interés en biomedicina por estar relacionadas con importantes enfermedades humanas (78, 79).

La parte proteica de esta familia es muy variable, tanto en tamaño, que abarca desde 14kDa hasta más de 100kDa, como en su conformación. Sin embargo, en todas ellas se encuentran dos motivos comunes: la secuencia señal en el extremo amino terminal, necesaria para la translocación de la proteína al RE y la señal de anclaje al motivo GPI localizada en el extremo carboxilo terminal (Fig. 9B). La señal de anclaje es de carácter hidrofóbico por lo que mantiene al precursor proteico unido a la membrana hasta que se produce la transferencia al motivo GPI. En levadura, además de estos dominios comunes, las proteínas ancladas a GPI poseen una región enriquecida en Serinas y Treoninas susceptible de O-glicosilación (80-82).

El motivo GPI es una estructura compleja que comprende una fosfoetanolamina por donde se une la proteína, un esqueleto de glicanos y un fosfolípido (Figura 9C). Una vez sintetizado, el GPI se añade al extremo carboxilo de una proteína soluble mediante una reacción de transamidación que tiene lugar en el lumen del RE. Esta proteína soluble es a su vez el producto de la escisión de la proteína precursora transmembrana (83).

Tras el anclaje, el motivo GPI es sometido a una serie de modificaciones, denominadas en su conjunto *remodeling*, que comienzan con la eliminación del grupo acilo del inositol y culminan con la sustitución del motivo lipídico inicial insaturado por otro de carácter saturado con un mayor número de carbonos (Figura 10). El *remodeling* del motivo GPI conlleva la asociación de las proteínas ancladas a GPI a dominios específicos de membrana enriquecidos en ceramida también denominadas balsas lipídicas o *rafts*, los cuales pueden aislarse bioquímicamente como una fracción de membranas resistentes a detergente o DRM (84).

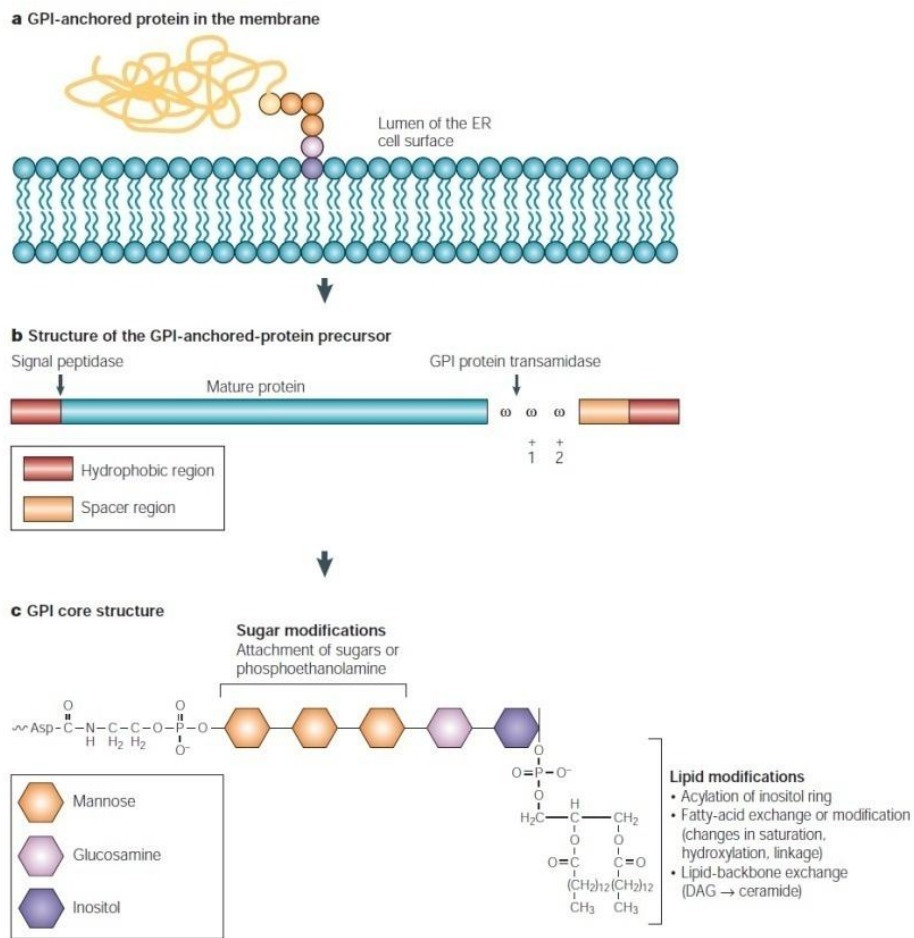


Figura 9. Representación gráfica de la estructura del motivo GPI y del precursor proteico (83)

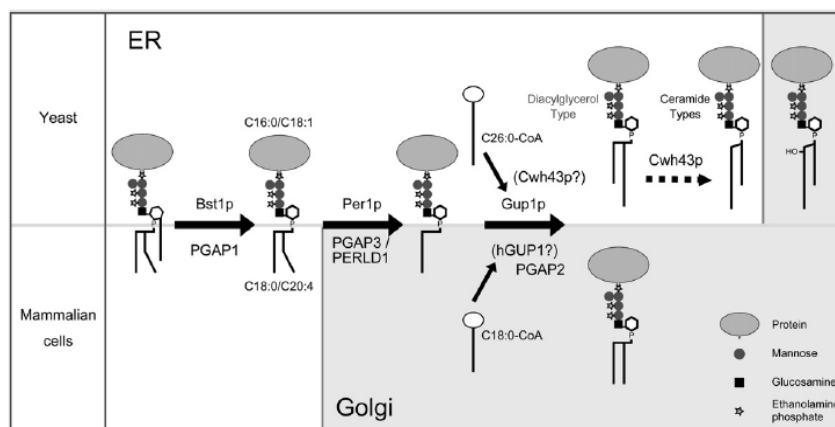


Figura 10. Proceso de *remodeling* de las proteínas ancladas a GPI en mamíferos y levaduras (85).

Una vez remodeladas, las proteínas ancladas a GPI recién sintetizadas abandonan eficientemente el RE en vesículas COPII para viajar hasta el Golgi desde donde alcanzan la membrana plasmática. Al igual que las proteínas carga solubles, las proteínas ancladas a GPI son completamente lumenales por lo que no pueden interactuar directamente con la cubierta citosólica COPII para salir eficientemente del RE. Por lo tanto se ha propuesto que las proteínas ancladas a GPI necesitan de un receptor de transporte transmembrana que las capture y concentre en los ERES primero y en las vesículas COPII después. Este posible papel de receptor podría ser llevado a cabo por el complejo p24. En este sentido, estudios previos realizados en la levadura han demostrado que el complejo p24 juega un papel directo en la exportación del RE de las proteínas ancladas a GPI. Esta hipótesis se sustenta en las siguientes evidencias experimentales:

1. La desaparición del complejo p24 en los mutantes *emp24Δ* y *erv25Δ* produce un retraso selectivo en el transporte RE-Golgi de la proteína anclada a GPI Gas1p (66, 86).
2. Otras proteínas ancladas a GPI se acumulan en el RE en el mutante *emp24Δ* (43).
3. La mutación *emp24Δ* afecta selectivamente a la incorporación de Gas1p en las vesículas COPII derivadas del RE en un ensayo *in vitro* de formación de vesículas (87).
4. La incorporación de Gas1p en las vesículas COPII es específicamente inhibida cuando las membranas del RE se incuban con un anticuerpo dirigido contra el tallo citosólico de Emp24p (87).
5. Las proteínas p24, Emp24p y Erv25p, interactúan con Gas1p en el interior de vesículas COPII purificadas (87).
6. Por último, tanto el tallo citosólico de Emp24p como de Erv25p unen con gran afinidad al complejo COPII (68).

En base a estos resultados, se propuso que el complejo p24 promueve la salida eficiente del RE de las proteínas ancladas a GPI actuando como un receptor de transporte (87). Esta función potencial del complejo p24 como receptor podría estar conservada en células de mamífero ya que el silenciamiento de varios genes de la familia p24 retrasa específicamente el transporte RE-Golgi de las proteínas ancladas a GPI.

Aunque el modelo de receptor parece explicar satisfactoriamente la salida eficiente del RE de las proteínas ancladas a GPI, el hecho de que éstas posean unos requerimientos de transporte especiales, sugiere que su mecanismo de exportación del RE es en realidad mucho más complejo y sofisticado de lo que previamente se pensaba. De hecho, las proteínas ancladas a GPI son segregadas y separadas del resto de proteínas de secreción durante su transporte a lo

largo de la ruta secretora. En levaduras, esta segregación ocurre inicialmente durante la salida del RE. Las proteínas ancladas a GPI son concentradas en ERES específicos donde se incorporarán en vesículas COPII también específicas (43, 44) (Figura 11).

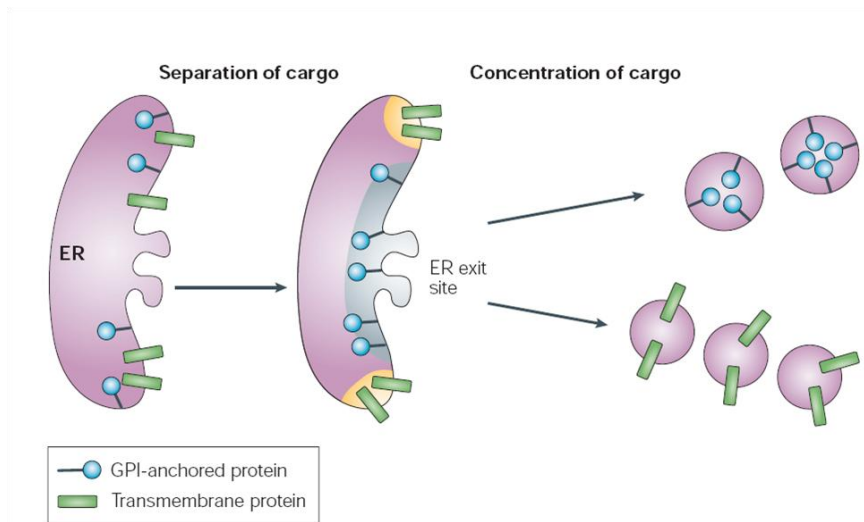


Figura 11. Segregación de las proteínas ancladas a GPI durante su exportación del RE (83).

Además, a diferencia del resto de las proteínas de secreción, se ha observado recientemente que las proteínas ancladas a GPI no emplean la maquinaria COPII para concentrarse en ERES. En su lugar, la concentración depende del proceso de *remodeling* al que se ve sometido el motivo GPI después del anclaje de la proteína (43). Una posible explicación es que la asociación a *rafts* de las proteínas ancladas a GPI remodeladas promueva su concentración en ERES de manera independiente al ensamblaje de la cubierta COPII. Esto implicaría que la cubierta COPII solo actuaría para deformar la membrana y generar la vesícula de transporte después de que las proteínas ancladas a GPI se hayan concentrado. Por tanto, si el mecanismo de concentración no está acoplado al ensamblaje de la cubierta COPII, no habría necesidad de un receptor de transporte para concentrar a las proteínas ancladas a GPI en sus ERES específicos. En consecuencia, el complejo p24 no funcionaría realmente como un receptor clásico, pudiendo promover la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a GPI en un proceso posterior a la concentración de éstas. Una posibilidad es que el complejo p24 actúe promoviendo la estabilización de la cubierta optimizando la formación de la vesícula en los ERES.

Por tanto, teniendo en cuenta todas las evidencias obtenidas hasta el momento, se antoja necesaria una revisión del modo de actuación del complejo p24 durante la exportación del RE de las proteínas ancladas a GPI.

4.3.3. Otras funciones propuestas para el complejo p24

Además de las funciones de la familia de proteínas p24 en el transporte vesicular anterógrado y retrógrado planteadas anteriormente, también se han propuesto otras funciones adicionales. El complejo p24 se ha relacionado con el tráfico intracelular de diversos tipos de moléculas como la invertasa en levadura o el receptor acoplado a proteínas G (PAR), quimaerinas y T1/ST2 en mamíferos (88-90). Curiosamente, algunas proteínas p24 se han identificado como componentes específicos del complejo de presenilina, responsable del procesamiento de moléculas como el precursor del amiloide, Notch y caderinas, modulando la actividad gamma secretasa (91-93). También se ha propuesto que el complejo p24 actúe de forma indirecta en el control de calidad del RE evitando la entrada pasiva de chaperonas y proteínas mal plegadas en las vesículas COPII (94). Por otro lado, se piensa que el complejo p24 está implicado activamente en el mantenimiento de la organización estructural del aparato de Golgi gracias a su capacidad para interactuar con determinadas proteínas de la matriz de Golgi (95) y de reclutar a la cubierta COPI (96). Dado que en mamíferos se ha estimado que las proteínas p24 representan aproximadamente el 30% de las proteínas transmembrana presentes en el Golgi (97), es esperable que desarrollen una importante función morfofuncional en este orgánulo.

OBJETIVOS

El propósito general de esta tesis es el análisis molecular de la función del complejo p24 en los procesos selectivos de transporte vesicular entre el RE y el aparato de Golgi en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para abordar este objetivo general se han planteado los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio de la función del complejo p24 en la formación de las vesículas COPI derivadas del Golgi.
2. Análisis del requerimiento del complejo p24 en la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a GPI.

RESULTADOS

Los resultados se presentan en forma de dos artículos, el primero de los cuales ya se ha publicado mientras que el segundo está siendo sometido a revisión.

ARTICULO I

**THE YEAST p24 COMPLEX IS REQUIRED FOR THE FORMATION OF COPI
RETROGRADE TRANSPORT VESICLES FROM THE GOLGI APPARATUS**

**Auxiliadora Aguilera-Romero, Joanna Kaminska, Anne Spang, Howard Riezman,
Manuel Muñiz.**

***J. Cell Biol.* 180:713-20**

The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus

Auxiliadora Aguilera-Romero,¹ Joanna Kaminska,² Anne Spang,³ Howard Riezman,⁴ and Manuel Muñiz¹

¹Department of Cell Biology, University of Seville, 41012 Seville, Spain

²Institute of Biochemistry and Biophysics PAS, 02-106 Warsaw, Poland

³Biozentrum, University of Basel, 4056 Basel, Switzerland

⁴Department of Biochemistry, University of Geneva, Sciences II, CH-1211 Genève 4, Switzerland

The p24 family members are transmembrane proteins assembled into heteromeric complexes that continuously cycle between the ER and the Golgi apparatus. These cargo proteins were assumed to play a structural role in COPI budding because of their major presence in mammalian COPI vesicles. However, this putative function has not been proved conclusively so far. Furthermore, deletion of all eight yeast p24 family members does not produce severe transport phenotypes, suggesting that the p24 complex is not essential for COPI

function. In this paper we provide direct evidence that the yeast p24 complex plays an active role in retrograde transport from Golgi to ER by facilitating the formation of COPI-coated vesicles. Therefore, our results demonstrate that p24 proteins are important for vesicle formation instead of simply being a passive traveler, supporting the model in which cargo together with a small GTPase of the ARF superfamily and coat subunits act as primer for vesicle formation.

Introduction

COPI vesicle-mediated retrograde transport from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum (ER) is crucial for eukaryotic cell physiology (Semenza et al., 1990). The molecular mechanisms that drive COPI vesicle generation are not completely understood (Spang, 2002). The current model, known as priming complex model (Springer et al., 1999), proposes that Arf1p, a small GTPase, is attracted to the Golgi membrane, where it is activated by a guanine exchange factor (ArfGEF). Membrane-bound, activated Arf1p then recruits coatamer, a preassembled complex of seven subunits, which forms a priming complex with a GTPase-activating protein (ArfGAP) and a transmembrane protein (cargo or SNARE). Once enough COPI priming complexes are established, they associate laterally to form a larger, polymeric coat on the Golgi membrane. This coat polymerization leads to the deformation of the membrane and, subsequently, to the COPI vesicle generation.

In addition to the coat components, transmembrane proteins might also be important for the budding process by acting

as a primer to form priming complexes (Springer et al., 1999). Specific COPI vesicle passengers, such as the members of the p24 family, have been suggested to play a role in COPI vesicle-mediated flow (Stammes et al., 1995; Bremser et al., 1999). The p24 proteins are assembled into heteromeric complexes that continuously cycle between ER and Golgi compartments (Sohn et al., 1996; Rojo et al., 1997; Fullekrug et al., 1999; Belden and Barlowe, 2001b). In yeast, at least four members of the p24 family (Emp24p, Erv25p, Erp1p, and Erp2p) function in the p24 complex (Marzioch et al., 1999). The yeast p24 complex plays a specialized role in selective cargo recruitment into specific ER-derived vesicles (Muñiz et al., 2000, 2001). Nevertheless, this is not likely to be the only function of the p24 complex in the early secretory pathway (Elrod-Erickson and Kaiser, 1996; Bremser et al., 1999; Lavoie et al., 1999; Emery et al., 2003). The p24 proteins have been assumed to play a structural role in COPI vesicle formation because of their ability to bind COPI proteins and their major presence in mammalian COPI vesicles (Stammes et al., 1995; Sohn et al., 1996). Indeed, mammalian p24 cytosolic tails displayed on liposomes can stimulate the formation of COPI vesicles (Bremser et al., 1999). Consistent with these findings and based on further *in vitro* experiments, it has been proposed that mammalian p24 proteins could inhibit

Correspondence to Manuel Muñiz: mmuniz@us.es

Abbreviations used in this paper: CPY, carboxypeptidase Y; UPR, unfolded protein response.

The online version of this manuscript contains supplemental material.

GTP hydrolysis by slowing down ArfGAP activity, thereby ensuring that coatomer can remain on the membrane in order to form COPI priming complexes required for vesicle formation (Goldberg, 2000; Lanoix et al., 2001). This model predicts a critical role for p24 proteins in COPI vesicle biogenesis. However, deletion of all eight yeast p24 family members does not produce severe transport phenotypes or morphological alterations in the endomembrane system, suggesting that p24 complex is not essential for COPI function (Springer et al., 2000). Therefore, whether p24 proteins are just COPI coat-binding cargo proteins or are required for COPI coated vesicle formation itself still remains a matter of debate. Here, we provide evidence that yeast p24 complex plays an active role in COPI vesicle budding from Golgi membranes.

Results and discussion

The *emp24Δ* and *erv25Δ* mutations interact genetically with mutant alleles of genes encoding for COPI vesicle coat components

To gain more insights into the functions of the yeast p24 complex in the early secretory pathway, we performed a screen for mutations that induce synthetic lethality upon disruption of the *EMP24* gene. We identified a genetic interaction between *EMP24* and *GLO3*, a gene encoding for an ArfGAP involved in COPI vesicle formation (Lewis et al., 2004). Confirming this result, *GLO3* could rescue the viability of the *emp24Δ glo3Δ* double mutant (Fig. 1 A). This genetic interaction is also true for other p24 members. As expected, the *erv25Δ glo3Δ* double mutant was inviable but could be complemented by *GLO3* (Fig. 1 A). Deletion of *EMP24* or *ERV25* destabilizes the other three proteins of the complex, leading to a complete loss of p24 function (Marzioch et al., 1999). Thus, it is rather likely that other members of the p24 family play a similar role as Emp24p and Erv25p with respect to interaction with Glo3p.

Two partially redundant ArfGAPs operate in retrograde traffic from Golgi to ER: Glo3p and Gcs1p (Poon et al., 1999). However, neither *emp24Δ* nor *erv25Δ* showed genetic interaction with *gcs1Δ* (Fig. 1 B). We also found that overexpression of *GCS1* was not able to restore growth of the *emp24Δ glo3Δ* double mutant (unpublished data). These results show that the genetic interaction between p24 coding genes and *GLO3* is specific and are consistent with previous findings that Glo3p and Gcs1p have only partially overlapping functions (Poon et al., 1999; Lewis et al., 2004; Yahara et al., 2006).

Because the ArfGAP Glo3p is a component of the COPI vesicle coat through interactions with the coatomer subunits Sec21p and Sec27p (Eugster et al., 2000; Lewis et al., 2004), we wanted to investigate the genetic interaction of p24 mutations with mutations in *SEC21* and *SEC27*. *emp24Δ* and *erv25Δ* showed a synthetic growth defect when combined with *sec21-1* (Fig. 1 C) and *sec27-1* (unpublished data) mutations.

Altogether, these genetic interactions between *emp24Δ* or *erv25Δ* and genes encoding COPI vesicle coat proteins involved in Golgi to ER transport strongly suggest that p24 proteins could participate in the formation of COPI vesicles.

The p24 complex is necessary for efficient trafficking from the Golgi to the ER when Glo3p GAP activity is reduced

The data presented in the previous paragraph suggest that the p24 family members play a more active role in the generation of COPI-coated vesicles than previously anticipated. In the wild-type situation, this role may not be essential. However, when the ArfGAP activity provided by Glo3p is missing or compromised, p24 function in COPI vesicle generation could become vital. To investigate this possibility, we assessed the lack of p24 function in the *ret4-1* mutant, a temperature-sensitive mutant allele of *GLO3* (Dogic et al., 1999). The T66I mutation in *ret4-1*, which is localized to the GTPase-activating domain of Glo3p, reduces the GAP activity toward ARF1 in vitro. We found that *emp24Δ ret4-1* mutant cells were viable at 24°C, but they grew slower than respective single mutant cells (Fig. 2 A). Furthermore, deleting *EMP24* increased the temperature sensitivity of the *ret4-1* allele, which is consistent with the observed genetic interaction between *emp24Δ* and *glo3Δ* (Fig. 2 A). Next, we investigated whether the *emp24Δ* deletion aggravates the slight defect of the *ret4-1* mutant in retrograde trafficking. Because anterograde and retrograde traffic between the ER and the Golgi are interdependent, a block in retrograde transport usually has an indirect effect on anterograde transport. Thus, we analyzed the post-translational processing of several early secretory pathway cargoes such as the vacuolar hydrolase, carboxypeptidase Y (CPY) (Stevens et al., 1982), and the secreted enzyme invertase (Esmon et al., 1987) in the *emp24Δ ret4-1* mutant, as an indirect way to measure defects in retrograde trafficking. Mutations in several COPI genes result in the accumulation of the immature CPY form (p1) at the ER and a general decrease in the glycosylation state of the secreted invertase (Gaynor and Emr, 1997). Likewise, the lack of p24 protein function in a *ret4-1* mutant led to an accumulation of the p1 form of CPY (Fig. 2 B) and exacerbated the impairment of the invertase glycosylation and secretion in the single mutants (Fig. 2 C), which is symptomatic of a severe defect in retrograde transport.

To assess more directly the defect of *emp24Δ ret4-1* double mutant cells in retrograde trafficking, we determined the secretion of the ER molecular chaperone Kar2p. Most mutants that block retrograde transport secrete elevated levels of ER resident proteins with an HDEL signal, including Kar2p, into the media because the HDEL receptor Erd2p fails to retrieve the ER escaped proteins back from the Golgi (Semenza et al., 1990). Previous studies have shown that overproduction of Erd2p mitigates Kar2p secretion (Semenza et al., 1990; Belden and Barlowe, 2001a). Nevertheless, in some trafficking mutants, such as p24 mutants, the activation of the unfolded protein response (UPR) also contributes to Kar2p secretion by exceeding the capacity of the HDEL-retrieval pathway (Belden and Barlowe, 2001a). Wild-type cells did not secrete Kar2p into the media, but *emp24Δ*, *ret4-1*, and *emp24Δ ret4-1* cells secreted significant amounts of Kar2p (Fig. 2 D). Interestingly, when *ERD2* was overexpressed in *emp24Δ* and *ret4-1* mutants Kar2p is not secreted into the growth media, whereas overexpression of *ERD2* in *emp24Δ ret4-1* cells did not reduce Kar2p secretion (Fig. 2 D). This defect in Kar2p retention might be due to an exacerbation of the

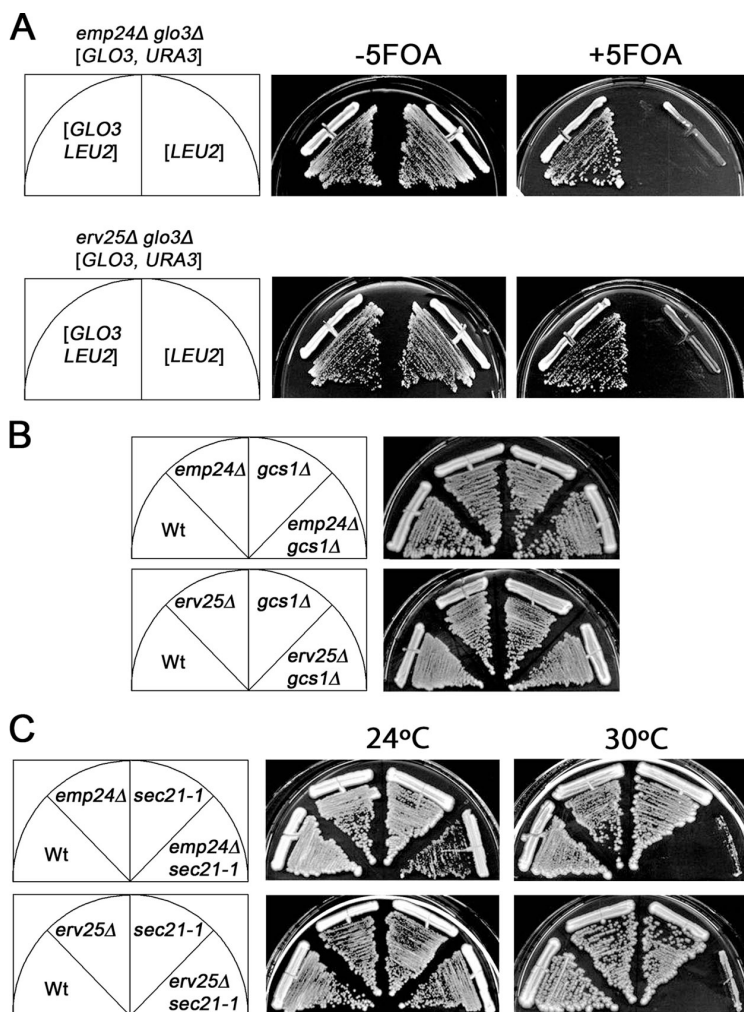


Figure 1. The *emp24Δ* and *erv25Δ* mutations interact genetically with mutant alleles of genes encoding for COPI vesicle coat components. (A) The *emp24Δ glo3Δ* strain with the *URA3* based plasmid bearing *GLO3* pMMY63 was transformed with *LEU2*-based empty vector pRS315 or *GLO3* encoding plasmid pMMY67. Double transformants were replica plated at 30°C on SD-leu-ura or on 5-FOA medium to induce loss of pMMY63. (B) The *emp24Δ* or *erv25Δ* strains were crossed with a *gcs1Δ* strain and the resulting haploid spores were tested for growth at 30°C on YPUAD. (C) *emp24Δ* or *erv25Δ* strains were crossed with a *sec21-1* strain and the resulting haploid spores were tested for growth at 24 and 30°C and grown on YPUAD.

UPR activation in *emp24Δ ret4-1* compared with *emp24Δ*. To address this possibility, we measured the UPR induction from a reporter construct (pJC31) that contains the 22-bp UPRE (unfolded protein responses element) of *KAR2* fused to *LacZ* (Cox and Walter, 1996). As shown in Fig. 2 E, β -galactosidase activity was not increased in the *emp24Δ ret4-1* cells compared with the *emp24Δ* strain. Therefore, we assumed that Kar2p secretion in these cells is mainly caused by a severe defect in retrieval of the Erd2p receptor rather than an overloading of the HDEL-retrieval system. The observed Kar2p secretion was not due to the cell lysis, as hexokinase, a cytosolic protein, was not found in the medium (Fig. 2 D).

Because COPI mutations also cause accumulation of ER membranes (Duden et al., 1994), we examined the morphology of the ER in *emp24Δ ret4-1*. We visualized the ER marker GFP-HDEL by fluorescence, which highlights the nuclear envelope as well as peripheral ER elements (Rossanese et al., 2001). As previously observed (Prinz et al., 2000), GFP-HDEL showed a massive proliferation of ER membranes in a *sec21-1* temperature-sensitive strain under conditions when retrograde transport is blocked (Fig. 2 F). Likewise, striking elaborations of the ER were apparent

in *emp24Δ ret4-1* cells, whereas the ER pattern observed in *emp24Δ* and *ret4-1* cells was identical to that in wild-type cells. Together, these data show that *emp24Δ ret4-1* double mutant cells exhibit COPI mutant-like phenotypes, supporting the idea of the involvement of the p24 complex in COPI function.

The p24 complex is required for COPI vesicle budding from Golgi membranes

Our genetic and biochemical findings suggest that the p24 complex might participate in retrograde transport from Golgi to ER by promoting the formation of COPI vesicles. We assessed directly this hypothesis by using an *in vitro* Golgi vesicle budding assay (Spang and Schekman, 1998). Enriched Golgi membranes devoid of ER from wild-type and *emp24Δ* strains were subjected to a vesicle budding assay by incubating them in the presence of GTP. Vesicles containing the COPI cargo Emp47p were produced by wild-type Golgi-enriched membranes (Fig. 3 A). In contrast, Golgi membranes from the *emp24Δ* mutant strain failed to form COPI vesicles (Fig. 3 A). This result indicates that the p24 complex plays an important role in COPI vesicle generation from Golgi membranes.

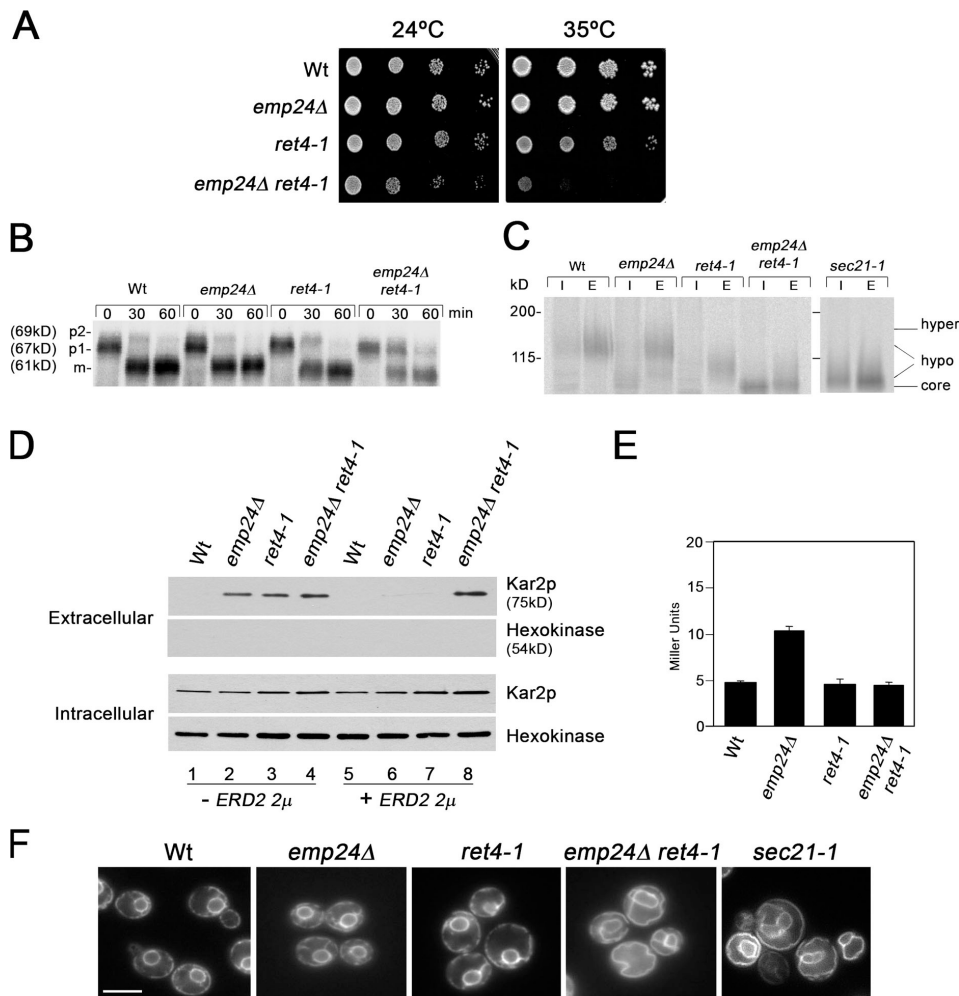


Figure 2. The *emp24Δ ret4-1* double mutant cells exhibit COPI mutant-like phenotypes. (A) *emp24Δ* strain was crossed with a *ret4-1* strain and the resulting haploid spores were tested for growth at 24 and 35°C on YPUAD. (B) Proliferating cells were radiolabeled for 5 min, chased for 30 min at 24°C, and lysed. CPY was immunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by PhosphorImager. ER (p1), Golgi (p2), and vacuole (m) CPY forms are indicated. (C) Low glucose-induced cells were pulse-labeled for 5 min and chased for 30 min at 24°C. Cells were converted to spheroplasts, and separated into intracellular (I) and extracellular (E) fractions from which invertase was immunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by PhosphorImager. Migration positions of core glycosylated, hypo-, and hyperglycosylated invertase are indicated. (D) Cells without (1, 2, 3, and 4) or with (5, 6, 7, and 8) *ERD2 2μ* plasmid (pJS209) were transferred to fresh media for 1 h at 24°C. Proteins contained in the cell culture supernatant were concentrated by TCA precipitation, resolved by SDS-PAGE, and Kar2p and Hexokinase were detected by immunoblotting. (E) β -Galactosidase assays were performed on strains harboring the reporter construct (pJC31). (F) Fluorescence images of cells expressing the ER-localized protein *GFP-HDEL*. Cells were grown at 24°C, except *sec21-1* cells, which were grown at 24°C and then shifted 40 min at 37°C. Bar, 5 μ m.

The p24 complex requirement for budding was observed only under coat-limiting conditions. Increasing the amount of coatomer and Arf1p in the budding assays restored COPI vesicle generation from *emp24Δ* Golgi membranes (Fig. 3 B). This COPI dosage dependence of budding strongly suggests that p24 proteins might facilitate the budding process by stabilizing coatomer on the Golgi membrane. This possibility is supported by a previous report showing that overexpression of *EMP24* suppresses *sec21-3* temperature sensitivity (Sandmann et al., 2003). Thus, the phenotype enhancement in the *emp24Δ sec21-1* mutant might be due to the failure of cargo proteins to create enough priming complexes that would support budding in the absence of p24 proteins. Increasing the stability of coatomer on

Golgi membranes might rescue the *emp24Δ sec21-1* mutant phenotype. Because ArfGAPs have been shown to potentiate the binding of coatomer to cargo proteins and consequently promote the stabilization of COPI priming complexes (Rein et al., 2002; Lee et al., 2005), we tested whether the temperature sensitivity of *emp24Δ sec21-1* and *erv25Δ sec21-1* is suppressed by overexpression of *Glo3p* and *Gcs1p*. Indeed, overexpression of *GLO3* was able to restore growth of *emp24Δ sec21-1* and *erv25Δ sec21-1* at the restrictive temperature, whereas overexpression of *GCS1* did not rescue the lethal phenotypes (Fig. 4 A). This result is consistent with the role of *Glo3p* as a specific component of the COPI vesicle coat through association with the coatomer subunit *Sec21p* (Lewis et al., 2004), and provides

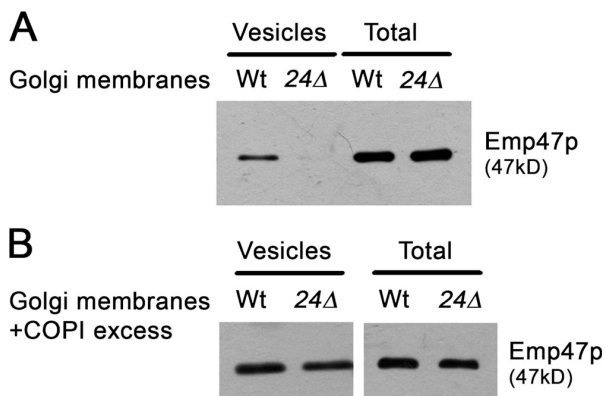


Figure 3. Golgi membranes derived from *emp24Δ* mutant cells are defective for the generation of COPI vesicles *in vitro*. Vesicles were generated from wild-type and *emp24Δ* (RH4443) Golgi membranes, which were incubated with GTP in the absence (A) or the presence of an excess of COPI components (B). The vesicles were purified over a velocity gradient, and subsequently floated on a Nycodenz gradient. Vesicle-containing fractions were collected and pooled, TCA precipitated, resolved on SDS-PAGE, and analyzed by immunoblot using antibody against Emp47p.

further evidence that p24 family proteins are important to stabilize priming complexes on Golgi membranes, which allows efficient polymerization of the COPI coat.

If our hypothesis is correct that p24 proteins are relevant for COPI priming complex formation, they should efficiently recruit COPI coat components such as coatamer and Glo3p. It has already been demonstrated that Emp24p and Erv25p bind coatamer (Belden and Barlowe, 2001b). Next, we tested whether Glo3p is also able to interact specifically with p24 proteins. Peptides corresponding to the C-terminal 10 amino acids of Emp24p or Erv25p were coupled to Sepharose beads and incubated with cytosol. We detected binding of Glo3p to both tail sequences (Fig. 4 B). In contrast, Gcs1p was not recruited to either the Emp24p or the Erv25p tail, supporting the idea that Gcs1p is not part of the COPI coat complex. Furthermore, recombinant Glo3p bound directly to the p24 tails (Fig. 4 C). Our data demonstrate that p24 proteins recruit COPI coat components. Together, our results show that p24 proteins can form COPI priming complexes and that these complexes are required to form retrograde COPI-coated vesicles efficiently from Golgi membranes.

UPR compensates the loss of retrograde transport function in the absence of p24 proteins

We have established in the previous paragraph that p24 complex form priming complexes. However, p24 genes are not essential in yeast. Indeed, deletion of all eight p24 family members does not produce severe transport phenotypes (Springer et al., 2000). Yet, subclasses of secretory proteins accumulate in the ER. How can this apparent discrepancy between the importance of p24 proteins for vesicle generation and the mild phenotypes of their deletion be reconciled? Perhaps a compensatory mechanism exists that helps the cell to cope with the loss of p24 proteins. Indeed, deletion of *ERV25* leads to UPR activation (Belden and Barlowe, 2001a). Moreover, the concomitant loss of *ERV25* (or *EMP24*)

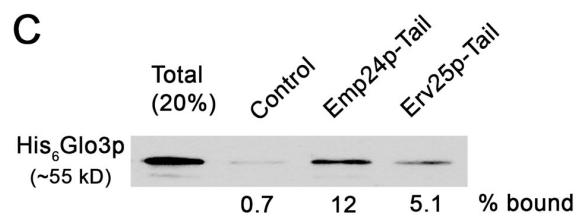
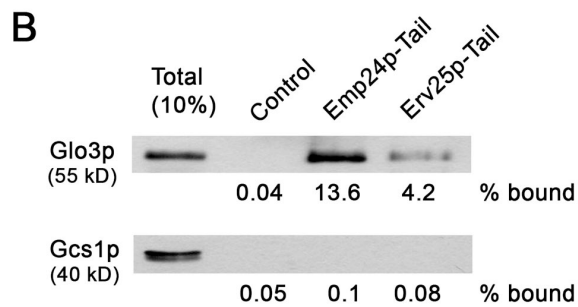
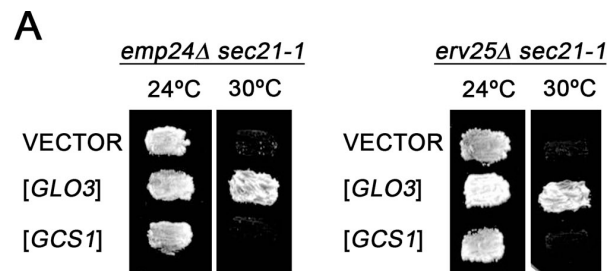
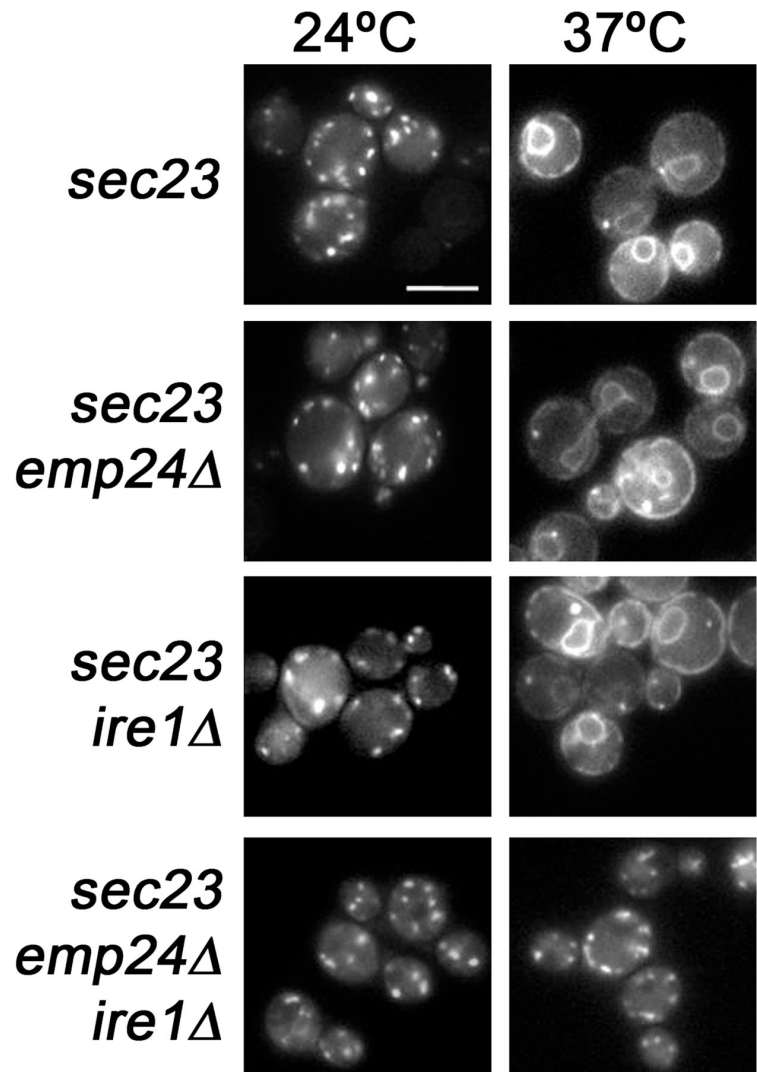


Figure 4. Specific genetic and physical interactions between p24 members and COPI coat components. (A) The *emp24Δ sec21-1* and *erv25Δ sec21-1* cells were transformed with empty plasmid (YEp352) or a high-copy plasmid carrying either the *GLO3* (pPPL43) or the *GCS1* gene (pPP421). Transformed cells were tested for growth at 24 and 30°C. (B and C) Synthetic peptides corresponding to cytoplasmic domains of Emp24p (RRFFEVTSLV) and Erv25p (KNYFKTKHII) were coupled to thiopropyl-Sepharose beads and incubated with cytosol (B) or recombinant Glo3p (C). Bound material was resolved by SDS-PAGE and analyzed by immunoblot using antibodies against Glo3p and Gcs1p.

and *IRE1*, an ER-localized kinase that activates the UPR, results in slow growth and more severe transport defects (Belden and Barlowe, 2001a). Accordingly, a genetic interaction between *emp24Δ* and *hac1Δ*, a transcriptional activator for a set of UPR-regulated genes, was observed during the genetic screen (unpublished data). We wanted to test directly whether UPR activation is responsible for the lack of an obvious retrograde trafficking defect in the *emp24Δ* strain. We assessed this possibility by determining whether the Golgi protein Rer1p, which cycles through the ER (Sato et al., 1997), is efficiently recycled back to the ER in an *emp24Δ ire1Δ* strain. We blocked ER exit with the temperature-sensitive *sec23-1* (COPII) allele to trap cycling proteins in the ER (Sato et al., 1997). If retrograde transport of Rer1p-GFP depends on both the p24 complex and on UPR, an *emp24Δ ire1Δ sec23-1* triple mutant strain should not accumulate Rer1p in the ER upon shift to the restrictive temperature (37°C). As shown in Fig. 5, in *sec23-1*, *emp24Δ sec23-1*, and *ire1Δ sec23-1* mutant cells at 24°C, Rer1p-GFP showed punctuate staining typical for Golgi in yeast, whereas at 37°C, the ER-characteristic nuclear

Figure 5. UPR compensates the loss of retrograde transport function in the absence of p24 proteins. Cells expressing Rer1p-GFP were observed by fluorescence microscopy at 24°C, or after the shift to 37°C for 20 min. Bar, 5 μm.



ring staining was observed. In contrast, when Rer1p-GFP was expressed in *emp24Δ ire1Δ sec23-1* triple mutant cells at 37°C, no ER staining was observed and Rer1-GFP remained in the Golgi (Fig. 5). This result demonstrates that retrograde traffic is affected in the *emp24Δ ire1Δ sec23-1* mutant cells at 37°C, indicating that UPR can compensate for the loss of p24 function in retrograde transport from Golgi to the ER. This compensatory effect could rely on the control that the UPR exerts over many aspects of secretory function, including retrograde transport. Indeed, genes involved in Golgi retrieval, such as genes encoding for several coatamer subunits (i.e., SEC27) are up-regulated by the UPR (Travers et al., 2000). Because the p24 complex requirement for budding is overcome by increasing the amount of coatamer, it remains possible that the up-regulation of the COPI genes helps the cell to cope with the loss of the p24 proteins. In addition, it is also possible that activity of COPI is up-regulated post-translationally by the UPR, for instance by phosphorylation. Indeed, the phosphorylation of several coatamer subunits has been reported (Sheff et al., 1996).

This study further supports the notion that certain transmembrane cargoes, such as the p24 protein family members, might be essential components in the regulation of vesicle formation instead of simply being a passive traveler. p24 proteins could recruit initially the deactivated form of Arf1p, (Gommel et al., 2001) facilitating the formation of a COPI priming complex and subsequently enabling efficient budding. In addition, the ability of p24 proteins to oligomerize and to present multiple coatamer-binding motifs might promote COPI budding by docking coatamer more firmly to the membrane (Bethune et al., 2006). Overexpression of coatamer-binding tails in oligomeric complexes has been shown to overcome the lethality of *sec21-3* at the nonpermissive temperature presumably by stabilizing coatamer on the Golgi (Sandmann et al., 2003). Moreover, p24 complex might play a key role in the stabilization of priming complexes by modulating the ArfGAP activity (Goldberg, 2000; Lanoix et al., 2001). Thus, other cargo proteins with lower coatamer affinity, like the single tail exposing Emp47p, could be captured by stabilized priming complexes and then be sorted into COPI vesicles.

Materials and methods

Yeast strains and growth conditions

Strains of *Saccharomyces cerevisiae* used for this work are listed in Table S1 (available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200710025/DC1>). Standard genetic manipulations were used throughout (Sherman, 1991). Strain RH6148 was made by replacement of *EMP24* ORF by *natMX* (Goldstein and McCusker, 1999) disruption cassette in the Y2922 background. Strain MMY104 was obtained by replacing the entire *IRE1* coding sequence of RH1433 with a *HphMX* disruption cassette (Goldstein and McCusker, 1999). Strains MMY103 and MMY91 were constructed by crossing MMY104 with RH4443. Strain MMY369 was constructed by crossing RH441 with PC238. Strains MMY409, MMY410, MMY419, and MMY518 were constructed by crossing MMY369 and RH1469 with BGY418. Cells were grown in either rich medium YPUAD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, and 40 mg/ml each of adenine and uracil) or minimal medium SD (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, and the required nutrients).

Synthetic lethal screen

Synthetic lethal screen was performed as described by Tong et al. (2001), using an *emp24Δ* mutant (RH6148) as a bait strain. The yeast knockout collection (YKO) and wild-type strain Y2922 were provided by C. Boone (University of Toronto, Ontario, Canada; Tong et al., 2001). In total, 72 double-deletion combinations were found that resulted in a potential synthetic growth defect.

Plasmids

To generate pMM63 and pMM67, the *SacI*-*SmaI* fragment from pNY24-3HA-GLO3 (Yahara et al., 2006) containing the *GLO3* gene was subcloned in the vectors pRS416 and pRS315, respectively. Other plasmids used in this study are pSKY5/RER1-0 (a CEN-based *URA3* plasmid carrying *Rer1*-GFP; Sato et al., 1997), pPPL43 and pPP421 (a 2 μ -based *URA3* plasmid with *GLO3* and *GCS1*, respectively; Poon et al., 1999), pJS209 (a 2 μ -based *URA3* plasmid with *ERD2*; Semenza et al., 1990), and pJC31 (a CEN-based *TRP1* plasmid with *UPRE1,2-CYC-lacZ*; Cox and Walter, 1996).

Pulse-chase analysis of CPY and invertase

Radiolabeling and immunoprecipitations were performed as described by Sutterlin et al. (1998). For invertase secretion, cells were induced as described by Kübler et al. (1994) and internal and external invertase was assayed as described by Gaynor and Emr (1997).

Analysis of Kar2 secretion

Extracellular Kar2p secretion was analyzed as described by Belden and Barlowe (2001a).

β -Galactosidase assay

Assays of β -galactosidase activity in extracts of yeast cells containing the *UPRE-lacZ* fusion construct, pJC31, were performed as described by Cox and Walter (1996).

In vitro Golgi budding assay

Golgi membranes and COPI components were purified as described by Spang and Schekman (1998). The Golgi budding assay was performed as described by Lewis et al. (2004) with several modifications. For the Golgi budding reactions, membranes were incubated in the presence of 0.1 mM GTP without (coat-limited conditions) or with an excess of coatomer (250 μ g/ml), and Arf1 protein (80 μ g/ml) at 30°C for 30 min in a total volume of 180 μ l. Samples were loaded on a Ficoll-sucrose gradient consisting of 135 μ l of 60% (wt/vol) sucrose, 360 μ l of 7.5%, 450 μ l of 5, 4, and 3%, and 360 μ l of 2% (wt/wt) Ficoll in 15% (wt/vol) sucrose in 20 mM Hepes, pH 6.8, 5 mM Mg(OAc)₂, and 150 mM KOAc (B88*). The vesicles were separated from the Golgi apparatus by centrifugation for 90 min at 42,000 rpm (TLS55 rotor; Beckman Coulter). 540 μ l from the top was discarded and the next 540 μ l were mixed with an equal volume of 80% Nycodenz in B88*, and overlaid with 276 μ l of 35, 25, 20, and 15% and 184 μ l of 10% Nycodenz in B88*. The gradients were centrifuged for 16 h at 50,000 rpm (TLS55 rotor; Beckman Coulter). Fractions (150 μ l) were collected from the top. Vesicle-containing fractions (5, 6, 7) were collected and pooled, TCA precipitated, resolved on SDS-PAGE, and analyzed by immunoblot.

Pull-down assay

Synthetic peptides corresponding to the 10 C-terminal amino acids of Emp24p (RRFFVETSLV) and Erv25p (KNYFKTKHII) with an N-terminal

cysteine residue were generated (IPT Peptide Technologies) and linked to thiopropyl-Sepharose 6B (GE Healthcare) as described by Belden and Barlowe (2001b). Cytosol from a *pep4Δ* strain (RH732) was obtained as described by Muñiz et al. (2000). Recombinant Glo3p was purified as described by Rein et al. (2002). In vitro binding reactions were performed as described by Belden and Barlowe (2001b). The immunoblot was quantified by densitometry.

Light microscopy

For fluorescence microscopy of GFP-tagged strains, log-phase cells grown in minimal media were observed directly. Acquisition was performed at 24°C using a Leica DMR microscope equipped with an objective lens (HCX PL APO 63 \times /1.32 OIL Ph3), a DC 350F camera, and Image Manager 50 v1.20 following the instructions of the manufacturer.

Online supplemental material

Table S1 provides information about the yeast strains used during this study. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200710025/DC1>.

We thank F. Letourneur, A. Nakano, P. Poon, B. Glick, C. Barlowe, C. Boone, P. Walter, and C. de Virgilio for materials and advice; and A. Velasco for critical reading of the manuscript.

This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia grant (BFU2005-01642) and an EMBO short-term fellowship (to M. Muñiz), grants from the Swiss National Science Foundation (to H. Riezman and A. Spang) and the University of Geneva (to H. Riezman) and the University of Basel (to A. Spang), grant N303 101 32/3456 (to J. Kaminska), and a University of Seville fellowship (to A. Aguilera).

Submitted: 3 October 2007

Accepted: 25 January 2008

References

- Belden, W.J., and C. Barlowe. 2001a. Deletion of yeast p24 genes activates the unfolded protein response pathway. *Mol. Biol. Cell.* 12:957–959.
- Belden, W.J., and C. Barlowe. 2001b. Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J. Biol. Chem.* 276:43040–43048.
- Bethune, J., M. Kol, J. Hoffmann, I. Reckmann, B. Brugger, and F. Wieland. 2006. Coatomer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Mol. Cell. Biol.* 26:8011–8021.
- Bremser, M., W. Nickel, M. Schweikert, M. Ravazzola, M. Amherdt, C.A. Hughes, T.H. Sollner, J.E. Rothman, and F.T. Wieland. 1999. Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell.* 96:495–506.
- Cox, J.S., and P. Walter. 1996. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell.* 87:391–404.
- Dogic, D., B. de Chasse, E. Pick, D. Cassey, Y. Lefkir, S. Hennecke, P. Cosson, and F. Letourneur. 1999. The ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Glo3p is involved in ER retrieval. *Eur. J. Cell Biol.* 78:305–310.
- Duden, R., M. Hosobuchi, S. Hamamoto, M. Winey, B. Byers, and R. Schekman. 1994. Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J. Biol. Chem.* 269:24486–24495.
- Elrod-Erickson, M.J., and C.A. Kaiser. 1996. Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol. Biol. Cell.* 7:1043–1058.
- Emery, G., R.G. Parton, M. Rojo, and J. Gruenberg. 2003. The trans-membrane protein p25 forms highly specialized domains that regulate membrane composition and dynamics. *J. Cell Sci.* 116:4821–4832.
- Esmon, P.C., B.E. Esmon, I.E. Schauer, A. Taylor, and R. Schekman. 1987. Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. *J. Biol. Chem.* 262:4387–4394.
- Eugster, A., G. Frigerio, M. Dale, and R. Duden. 2000. COPI domains required for coatomer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP. *EMBO J.* 19:3905–3917.
- Fullekrug, J., T. Saganuma, B.L. Tang, W.J. Hong, B. Storrie, and T. Nilsson. 1999. Localization and recycling of gp27 (hp24 gamma(3)): complex formation with other p24 family members. *Mol. Biol. Cell.* 10:1939–1955.
- Gaynor, E.C., and S.D. Emr. 1997. COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J. Cell Biol.* 136:789–802.

- Goldberg, J. 2000. Decoding of sorting signals by coatamer through a GTPase switch in the COPI coat complex. *Cell*. 100:671–679.
- Goldstein, A.L., and J.H. McCusker. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15:1541–1553.
- Gommel, D.U., A.R. Memon, A. Heiss, F. Lottspeich, J. Pfannstiel, J. Lechner, C. Reinhard, J.B. Helms, W. Nickel, and F.T. Wieland. 2001. Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J*. 20:6751–6760.
- Kübler, E., F. Schimmöler, and H. Riezman. 1994. Calcium-independent calmodulin requirement for endocytosis in yeast. *EMBO J*. 13:5539–5546.
- Lanoix, J., J. Ouwendijk, A. Stark, S. Szafer, D. Cassel, K. Dejgaard, M. Weiss, and T. Nilsson. 2001. Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *J. Cell Biol*. 155:1199–1212.
- Lavoie, C., J. Paiement, M. Dominguez, L. Roy, S. Dahan, J.N. Gushue, and J.J.M. Bergeron. 1999. Roles for alpha(2)p24 and COPI in endoplasmic reticulum cargo exit site formation. *J. Cell Biol*. 146:285–299.
- Lee, S.Y., J.S. Yang, W.J. Hong, R.T. Premont, and V.W. Hsu. 2005. ARFGAP1 plays a central role in coupling COPI cargo sorting with vesicle formation. *J. Cell Biol*. 168:281–290.
- Lewis, S.M., P.P. Poon, R.A. Singer, G.C. Johnston, and A. Spang. 2004. The ArfGAP Glo3 is required for the generation of COPI vesicles. *Mol. Biol. Cell*. 15:4064–4072.
- Marzioch, M., D.C. Henthorn, J.M. Herrmann, R. Wilson, D.Y. Thomas, J.J.M. Bergeron, R.C.E. Solari, and A. Rowley. 1999. Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol. Biol. Cell*. 10:1923–1938.
- Muñiz, M., C. Nuoffer, H.P. Hauri, and H. Riezman. 2000. The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Cell Biol*. 148:925–930.
- Muñiz, M., P. Morsomme, and H. Riezman. 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 104:313–320.
- Poon, P.P., D. Cassel, A. Spang, M. Rotman, E. Pick, R.A. Singer, and G.C. Johnston. 1999. Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *EMBO J*. 18:555–564.
- Prinz, W.A., L. Grzyb, M. Veenhuis, J.A. Kahana, P.A. Silver, and T.A. Rapoport. 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol*. 150:461–474.
- Rein, U., U. Andag, R. Duden, H.D. Schmitt, and A. Spang. 2002. ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat. *J. Cell Biol*. 157:395–404.
- Rojó, M., R. Pepperkok, G. Emery, R. Kellner, E. Stang, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1997. Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport. *J. Cell Biol*. 139:1119–1135.
- Rossanese, O.W., C.A. Reinke, B.J. Bevis, A.T. Hammond, I.B. Sears, J. O'Connor, and B.S. Glick. 2001. A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol*. 153:47–61.
- Sandmann, T., J.M. Herrmann, J. Dengjel, H. Schwarz, and A. Sprang. 2003. Suppression of coatamer mutants by a new protein family with COPI and COPII binding motifs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell*. 14:3097–3113.
- Sato, K., M. Sato, and A. Nakano. 1997. Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94:9693–9698.
- Semenza, J.C., K.G. Hardwick, N. Dean, and H.R.B. Pelham. 1990. ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell*. 61:1349–1357.
- Sheff, D., M. Lowe, T.E. Kreis, and I. Mellman. 1996. Biochemical heterogeneity and phosphorylation of coatamer subunits. *J. Biol. Chem*. 271:7230–7236.
- Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol*. 194:3–21.
- Sohn, K., L. Orci, M. Ravazzola, M. Amherdt, M. Bremser, F. Lottspeich, K. Fiedler, J.B. Helms, and F.T. Wieland. 1996. A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatamer binding. *J. Cell Biol*. 135:1239–1248.
- Spang, A. 2002. ARF1 regulatory factors and COPI vesicle formation. *Curr. Opin. Cell Biol*. 14:423–427.
- Spang, A., and R. Schekman. 1998. Reconstitution of retrograde transport from the Golgi to the ER in vitro. *J. Cell Biol*. 143:589–599.
- Springer, S., A. Spang, and R. Schekman. 1999. A primer on vesicle budding. *Cell*. 97:145–148.
- Springer, S., E. Chen, R. Duden, M. Marzioch, A. Rowley, S. Hamamoto, S. Merchant, and R. Schekman. 2000. The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:4034–4039.
- Stammes, M.A., M.W. Craighead, M.H. Hoe, N. Lampen, S. Geromanos, P. Tempst, and J.E. Rothman. 1995. An integral membrane component of coatamer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:8011–8015.
- Stevens, T., B. Esmon, and R. Schekman. 1982. Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase-Y to the vacuole. *Cell*. 30:439–448.
- Sutterlin, C., M.V. Escribano, P. Gerold, Y. Maeda, M.J. Mazon, T. Kinoshita, R.T. Schwarz, and H. Riezman. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* GPI10, the functional homologue of human PIG-B, is required for glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis. *Biochem. J*. 332:153–159.
- Tong, A.H.Y., M. Evangelista, A.B. Parsons, H. Xu, G.D. Bader, N. Page, M. Robinson, S. Raghibizadeh, C.W.V. Hogue, H. Bussey, et al. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*. 294:2364–2368.
- Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman, and P. Walter. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101:249–258.
- Yahara, N., K. Sato, and A. Nakano. 2006. The Arf1p GTPase-activating protein Glo3p executes its regulatory function through a conserved repeat motif at its C-terminus. *J. Cell Sci*. 119:2604–2612.

ARTICULO II

**ROLE OF THE YEAST p24 COMPLEX IN GPI-ANCHORED PROTEIN QUALITY
CONTROL BY MONITORING LIPID REMODELING**

**Guillaume A. Castillon, Auxiliadora Aguilera-Romero, Sharon Epstein, Javier Manzano,
Kentaro Kajiwara, Kouichi Funato, Reika Watanabe, Howard Riezman, Manuel Muñiz.**

Role of the Yeast p24 Complex in GPI-anchored Protein Quality Control by Monitoring Lipid Remodeling

Guillaume A. Castillon,^{**†} Auxiliadora Aguilera-Romero,^{†‡} Sharon Epstein,^{*} Javier Manzano,[‡] Kentaro Kajiwara,[§] Kouichi Funato,[§] Reika Watanabe,^{*} Howard Riezman,^{*} Manuel Muñiz[‡]

^{*} Department of Biochemistry, University of Geneva, Sciences II, CH-1211 Geneva 4, Switzerland; [‡] Department of Cell Biology, University of Seville, 41012 Seville, Spain; [§] Department of Bioresource Science and Technology, Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Kagamiyama 1-4-4, Higashi-Hiroshima 739-8528, Japan

[†] These authors contributed equally to this work

Address correspondence to: Manuel Muñiz (mmuniz@us.es) or Howard Riezman (Howard.Riezman@unige.ch)

Running head: GPI-anchored protein quality control

Abstract

Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins constitute a special category of secretory proteins that are attached to the cell surface of eukaryotic cells by a glycolipid moiety. Once GPI-anchoring has occurred in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), the structure of the lipid part on the GPI anchor undergoes a remodeling process prior to ER exit. In this study, we provide strong evidence that the yeast p24 complex, through binding specifically to GPI-anchored proteins in an anchor-dependent manner, is required for a mechanism that monitors anchor remodeling and prevents the progression of incompletely remodeled GPI-anchored proteins along the secretory pathway. Therefore, our findings imply that the p24 complex, in addition to its previously reported role in the ER export of GPI-anchored proteins, has a new specific quality control function that regulates the intracellular transport of these proteins and coordinates this with correct anchor remodeling.

Introduction

In eukaryotic cells, the secretory pathway is initiated by the selective incorporation of correctly folded and assembled secretory proteins into vesicles that mediate transport from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus. ER budding is driven by the assembly of cytosolic coat complex COPII at specific domains of the ER membrane, called ER exit sites (ERES) (Lee *et al.*, 2004). For efficient ER exit, most secretory proteins are thought to be actively captured and concentrated at ERES through interactions with the cytosolic COPII coat prior to budding (Lee *et al.*, 2004; Sato and Nakano, 2007). According to this cargo capture model, those secretory molecules that cannot interact directly with the COPII coat subunits, like soluble secretory proteins, might be selectively incorporated at ERES and COPII vesicles by interacting with a cargo-coat adaptor, which would couple cargo selection with vesicle coat assembly.

Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins constitute a special category of secretory cargo, which contains a soluble protein portion attached by a glycolipid anchor to the external leaflet of the plasma membrane (Orlean and Menon, 2007). Once glycolipid anchoring has occurred in the ER lumen, GPI-anchored proteins are delivered to the Golgi apparatus via COPII vesicles. Similar to soluble cargoes, GPI-anchored proteins are exclusively luminal and cannot interact directly with the cytosolic COPII coat. Therefore, a transmembrane cargo-coat adaptor may be required to recognize and concentrate the GPI-anchored proteins at ERES and COPII vesicles. This possible adaptor requirement might be fulfilled by the members of the conserved p24 family, which are abundant type I transmembrane proteins assembled into heteromeric complexes that cycle between the ER and Golgi compartments (Sohn *et al.*, 1996; Rojo *et al.*, 1997; Fullekrug *et al.*, 1999; Belden and Barlowe, 2001). In yeast, at least four members of the p24 family (Emp24p, Erv25p, Erp1p, and Erp2p) function in the p24 complex (Marzioch *et al.*, 1999). Previous studies have shown a direct role of the yeast p24 complex in the ER exit of GPI-anchored proteins. First, the p24 complex accelerates the transport rate of the GPI-anchored protein Gas1p to the Golgi and it is necessary for proper targeting of other GPI-anchored proteins to the cell surface (Schimmoller *et al.*, 1995; Belden and Barlowe, 1996; Castillon *et al.*, 2009). Second, the p24 complex is directly required for selective *in vitro* ER budding of Gas1p (Muniz *et al.*, 2000). Third, the p24 proteins can be crosslinked to Gas1p in purified ER-derived vesicles (Muniz *et al.*, 2000). Finally, the tail of the p24 proteins recruits

efficiently COPII coat subunits (Belden and Barlowe, 2001). Based on these observations we initially proposed that the yeast p24 complex can promote directly the efficient ER exit of GPI-anchored proteins by acting as a cargo-coat adaptor. Moreover, this potential adaptor function might be conserved in mammalian cells since ER-to-Golgi transport of GPI-anchored proteins is specifically delayed after silencing of the mammalian homologues of several yeast p24 genes (Takida *et al.*, 2008; Bonnon *et al.*, 2010).

Although the cargo-coat adaptor model offers a mechanistic explanation for the efficient ER exit of GPI-anchored proteins, their special transport requirements may suggest an alternative and more complex ER export mechanism than previously anticipated. Indeed, GPI-anchored proteins are sorted from other secretory proteins during their transport to the plasma membrane (Mayor and Riezman, 2004). In yeast, this sorting occurs initially upon exit from the ER. GPI-anchored proteins are selectively concentrated at specific ERES, from where they are incorporated into distinct transport vesicles (Muniz *et al.*, 2001; Castillon *et al.*, 2009). Moreover, we have shown that, in contrast to other secretory proteins, GPI-anchored proteins do not employ the COPII machinery for proper concentration at ERES. Instead, they use a concentrative mechanism that depends upon the remodeling of their GPI anchors (Castillon *et al.*, 2009). This process consists of the inositol deacylation followed by the replacement of the primary lipid moiety by another lipid containing a highly saturated acyl chain. In yeast, remodeling occurs at the ER after the anchor attachment to the protein, and leads to the association of GPI-anchored proteins to ceramide-enriched membrane domains, that can be biochemically isolated as a detergent resistant membranes (DRM) fraction (Pittet and Conzelmann, 2007; Fujita and Jigami, 2008). The recruitment of remodeled GPI-anchored proteins to DRMs might promote their concentration at ERES in a COPII independent manner. Therefore, the COPII function in the ER exit of GPI-anchored proteins might be restricted just to the final vesicle formation event after cargo concentration. Evidently, a coat independent concentrative mechanism would imply that a cargo-coat adaptor is not required for cargo concentration prior to budding. Consequently, the p24 complex may not act, as initially expected, like a conventional cargo-coat adaptor during the ER export of GPI-anchored proteins. Instead, its direct role in this process might be linked to COPII at the final budding stage. The p24 complex might potentially facilitate COPII vesicle formation by recruiting and stabilizing COPII components to the GPI-anchored protein containing ERES.

Therefore, the exact mode of action of the yeast p24 complex during the selective ER exit of GPI-anchored proteins is still unclear. To clarify this issue we tested several predictions

of the cargo-coat adaptor hypothesis directly, including the substrate binding capacity of the p24 complex and its influence on cargo concentration and sorting at ERES. Our results indicate that

the p24 complex does not behave as a conventional cargo-coat adaptor, suggesting that its export function must be subsequent to GPI-anchored protein remodeling and concentration at ERES. In addition, we found a new function of the p24 complex in the quality control of GPI-anchored proteins. We show that the p24 complex is required for a mechanism that monitors GPI anchor remodeling and effects the ER retention of incompletely remodeled GPI-anchored proteins. Therefore, our results suggest a dual role of the yeast p24 complex in the selective trafficking of GPI-anchored proteins (*i*) promoting the efficient ER exit of remodeled proteins and (*ii*) preventing the progression of unremodeled proteins along the secretory pathway.

Materials and Methods

Yeast strains and plasmids

Strains of *Saccharomyces cerevisiae* used for this work are listed in Table S1. The *erv14-mCi-SpHIS5* allele has been obtained after the PCR of the *mCi-SpHIS5* cassette from the EUROSCARF pKT211 plasmid, and after homologous recombination of the PCR product at the locus in the 3' of *ERV14* open reading frame (ORF) excluding the STOP codon (Longtine *et al.*, 1998). The plasmids expressing *Cwp2-Venus* (pRS416ADH-CWP2-VENUS), *Ccw14-Venus* (pRS416ADH-CCW14-VENUS) and *CFP-Hxt1p* (pRS415ADH-CERULEAN-HXT1) have been made in the previous study (Castillon *et al.*, 2009). The plasmid expressing *mRFP-Sed5p* has been kindly provided by A. Nakano (Matsuura-Tokita *et al.*, 2006). Other plasmids used in this study are *pGAS1*, *pGAS1TMD*, *pGAS1(-S/T)* (Watanabe *et al.*, 2008) and *pGAS1Q* (Nuoffer *et al.*, 1993). In order to construct the plasmid expressing *Sec13-mCh*, we first integrated by homologous recombination the PCR product containing *mCherry-KanMX* from *pBS34* (Yeast Resource Center: <http://depts.washington.edu/yeastrc/index.html>) in 3' of *SEC13* (ORF) excluding the STOP codon. From the strain newly obtained we amplified by PCR a fragment with a forward primer (gggatcaggaggcttccgagatttgg) hybridizing 500 base pairs (bp) upstream the *SEC13* ORF and a reverse primer (gggatcctcgcaggtctgcagcggcgc) recognizing the downstream sequence of *mCherry*. The PCR product has been inserted in *YCplac22* after enzymatic digestion by *EcoRV* to produce *YCplac22-Sec13-mCh*. *YCplac111-Emp24-CFP* has been produced after amplification of the region named arbitrarily *Emp24-1* upstream the codon 128 coding for asparagine of the *EMP24* ORF using the following primers (F1: gctctagacgataatggtcttcttggtaacc, R1: gcggatcctgggtcgtccaaatccacatata) and the region named *Emp24-2* downstream of codon 127 coding for proline of the *EMP24* ORF using the following primers (F2: gcggatccaacaccaatacattggatagtgc, R2: gccccggccactagtgtatgcgactgcgattca). Next the PCR product of *Emp24-1* was digested by *XbaI* and *BamHI* and the PCR product of *Emp24-2* was digested by *XmaI* and *BamHI*. Both digested fragments were ligated into *YCplac111* predigested by *XbaI* and *XmaI* in order to obtain *YCplac111-Emp24*. We then amplified the sequence coding for the fluorescent protein *CERULEAN* (Rizzo *et al.*, 2004) by PCR with a forward primer containing a *BamHI* site and a reverse primer excluding the stop codon of *CERULEAN* and a *BamHI* site. The fragment containing *CERULEAN* was inserted into *BamHI* digested *YCplac111-Emp24* plasmid to obtain *YCplac111-Emp24-CFP*.

Cross-Linking assay

EMP24-HA-tagged and untagged strains were first grown in SUD medium (0.16% yeast nitrogen base without amino acids and without $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, 2% glucose, 0.1% urea) supplemented with the required amino acids at 24°C to express Gap1p and then grown overnight in SDYE medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, and 0.2% yeast extract) supplemented with the required amino acids and nutrients at 24°C. 200ml of cells were harvested at 5×10^6 cell/ml, washed twice with SD medium, resuspended in 4 ml, and incubated 15 min at 24°C. Cells were then pulse-labelled for 3 min with EasyTAG™ express protein labeling mix (PerkinElmer Life Sciences) in SD medium at 24°C. Metabolic activity was stopped by the addition of NaN_3 (20mM final) and incubation on ice for 10 min. Spheroplasting and lysis was performed as described (Muniz et al., 2000). Before crosslinking reaction, permeabilized spheroplasts were resuspended in 2.5M Urea in B88 (20 mM Hepes, pH 6.8, 150 mM KOAc, 250 mM sorbitol, 5 mM $\text{Mg}[\text{OAc}]_2$) incubated for 10 min on ice, and washed twice with B88. 25×10^7 permeabilized spheroplasts were incubated with 0.5 mM dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP; Pierce) (20°C, 20 min). The cross-linking reaction was quenched by addition of glycine (50 mM final, 5 min, 20°C). A portion of the sample was removed for analysis (total), the remaining aliquot was dissolved with 1% SDS in TEPI (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM protease inhibitor mix) (5 min, 95°C for GPI-anchored proteins and CPY or 55°C for Gap1p and Hxt1p), and immunoprecipitated with anti-HA antibody, 12AC5 (Roche) and Protein G–Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Precipitated material was eluted from the Sepharose beads by incubation with 1% SDS in TEPI (5 min, 95 or 55°C), reimmunoprecipitated with anti-Gap1p, anti-CPY, anti-Gap1p or anti-GFP antibody, were incubated with 5% 2-β-mercaptoethanol and analyzed by SDS-PAGE with subsequent exposure and quantitation using a PhosphorImager.

GPI anchor remodeling and DRM partitioning

Phosphatidylinositol (PI) moieties of GPI anchor were isolated from GPI-anchored proteins labeled with $[\text{}^3\text{H}]$ myo-inositol as described previously (Guillas *et al.*, 2000; Fujita *et al.*, 2006). The lipids were separated by thin-layer chromatography using solvent system (55:45:10 chloroform-methanol-0.25% KCl), and visualized using FLA-7000 (Fujifilm). DRM portioning was performed as in (Bagnat *et al.*, 2000).

β-galactosidase assay

Assays of β-galactosidase activity in extracts of yeast cells containing the UPRE-*LacZ* fusion construct, pJC31, were performed as described by Cox and Walter (1996).

Pulse-chase analysis

Radiolabeling and immunoprecipitations were performed as described by Watanabe et al. (2002) with some modifications, cells were grown in SDYE medium supplemented with the required amino acids at 24°C to $0.5\text{--}2 \times 10^7$ /ml, harvested, and resuspended in SD medium without methionine and cysteine. 3×10^7 cells were used for each time point and preincubated at 24°C for 15 min and labeled with 100 μ Ci of EasyTAGTM express protein labeling mix, [³⁵S] (PerkinElmer Life Sciences) for 5 min.

Co-immunoprecipitation and stability of Emp24p

The co-immunoprecipitation experiments were performed as in (Marzioch *et al.*, 1999). Emp24-CFP has been precipitated with a monoclonal anti-GFP antibody (Roche). The protein levels of Emp24p and Erv25p after addition or not of cycloheximide (35 μ g/ml for 90 minutes) from log phase growing cultures were revealed after TCA precipitation by western-blot.

Microscopy

Acquisitions were done as previously described (Castillon *et al.*, 2009). The micrographs were acquired under a 100X 1.4NA oil objective with the AXIOZ1 microscope (ZEISS) and the Zeiss AxioCam MRm CCD camera controlled by the software AxioVision Rel. 4.6. If co-localization was required, then the acquisitions were deconvoluted by ten iterations using the Diffraction PSF 3D and the Iterative Deconvolve 3D plugins for Image J.

(<http://www.optinav.com/Diffraction-PSF-3D.htm>). The data were quantified and processed with Image J.

Results

The p24 complex interacts specifically with GPI-anchored proteins through their GPI anchor within the ER.

We have shown previously that the yeast p24 complex binds to the GPI-anchored protein Gas1p and is directly required for its efficient ER exit (Muniz *et al.*, 2000). These findings led to the idea that the p24 complex may constitute a conventional cargo-coat adaptor that collects GPI-anchored proteins into COPII vesicles to accelerate their transport to the Golgi. This hypothesis is reinforced by the fact that p24 complex requirement for ER exit is specific to all GPI-anchored proteins tested so far (Fig. S1 and (Castillon *et al.*, 2009)). To further examine the potential role of the p24 complex as an adaptor for GPI-anchored proteins, we investigated whether other GPI-anchored proteins interact with the p24 proteins within the ER. Pulse-radiolabelled yeast cells from *EMP24-HA*-tagged and untagged strains were converted to perforated spheroplasts and exposed to the cleavable cross-linker DSP. After solubilization, Emp24-HA was immunoprecipitated using anti-HA antibodies. The precipitates were denatured and subjected to a second immunoprecipitation using antibodies against different GPI-anchored proteins. The cross-linker was cleaved and the samples were analyzed by SDS-PAGE. Emp24-HA was cross-linked to the ER form of all the GPI-anchored proteins tested with good efficiency (Fig. 1A, B). No GPI-anchored proteins were recovered if cross-linker was omitted. Moreover, GPI-anchored proteins could not be detected when the cross-linking was performed on untagged membranes, proving the GPI-anchored proteins were recovered as part of a complex containing Emp24p. This association is specific because two unrelated transmembrane proteins, the aminoacid permease Gap1p and the glucose transporter Hxt1p, cannot be cross-linked to Emp24p (Fig. 1A, B). As an additional specificity control, the cargo binding capacity of the p24 complex was compared with Erv29p, a well-characterized ER cargo receptor (Belden and Barlowe, 2001). Whereas Erv29p can bind efficiently one of its known soluble cargoes, the vacuolar carboxypeptidase Y (CPY), the GPI-anchored protein Yps1p fails to be crosslinked to Erv29p (Fig. 1C) and CPY is not crosslinked to Emp24p. These crosslinking experiments show that Emp24p binds specifically to GPI-anchored proteins within the ER.

All GPI-anchored proteins seem to share two conserved motifs that could potentially function as a recognition motif for the p24 complex: the GPI anchor and a Serine/Threonine (S/T) region. The GPI-anchor is covalently attached to a newly generated COOH-terminal residue (ω -site) after cleavage of the GPI-attachment signal in the ER. The S/T region upstream of the ω -site (Caro *et al.*, 1997) is a site for O-mannosylation, which begins in the ER in yeast (Gentzsch and Tanner, 1997). To identify the region of GPI-anchored proteins binding to Emp24p we used three different mutant constructs of the Gas1p (Nuoffer *et al.*, 1993; Watanabe *et al.*, 2008). In one construct Gas1p is devoid of its GPI anchor and instead contains an artificial transmembrane domain (TMD) consisting of 19 leucine residues and two flanking arginine and serine residues (Gas1TMD). In a second construct Gas1p is deleted of its S/T region (Gas1(-S/T)). In the third construct Gas1p is mutated at the ω site to prevent GPI anchoring (Gas1Q). We observed that, only wild-type Gas1p and Gas1(-S/T) can be crosslinked to Emp24p (Fig. 1D, E). Therefore, these results show that Emp24p recognizes and binds to the GPI-anchored proteins via the GPI anchor prior to and/or during ER exit.

The p24 complex is not required to sort and concentrate GPI-anchored proteins into ERES.

According to the cargo-coat adaptor model, our results suggest that the p24 complex might interact with the GPI moiety to concentrate GPI-anchored proteins in ERES and COPII vesicles. To address this possibility, we assessed the ability of the p24 complex to accumulate GPI-anchored proteins into ERES. Cargo concentration at ERES can be visualized under fluorescence microscope by blocking the ER exit with the temperature-sensitive *sec31-1* (COPII) allele (Castillon *et al.*, 2009). If selective GPI-anchored protein incorporation into ERES depends on the p24 complex, an *emp24 Δ sec31-1* double mutant strain should not accumulate GPI-anchored proteins into ERES upon shift to the restrictive temperature (37°C). As previously described (Castillon *et al.*, 2009), in *sec31-1* mutant cells at 37°C the GPI-anchored protein Cwp2p showed punctuate staining corresponding to ERES in yeast. Likewise, this pattern was also reproduced in *emp24 Δ sec31-1* mutant cells at 37°C (Fig. 2A, B). We confirmed that these dots-like structures containing Cwp2p are ERES by co-localization with the COPII coat component Sec13p (Fig. 2C, D). These data show that the GPI-anchored protein concentration at ERES is not influenced by the p24 complex.

As a control, we used the disruption of *BST1*, which encodes for the first anchor remodeling enzyme that deacetylates the GPI inositol. We have previously shown that in *bst1Δ sec31-1* double mutant cells Cwp2p is not accumulated in ERES at 37°C, displaying just the characteristic ER nuclear ring staining (Fig. 2A). This defect in concentration at ERES, which is also observed in other remodeling mutants (Castillon *et al.*, 2009), is possibly due to the incapacity of unremodeled GPIAPs to associate to detergent resistant membrane (DRM) fractions formed at the ER in yeast (Maeda *et al.*, 2007). Therefore, we expected that, if the p24 complex is not required for GPI-anchored proteins concentration at ERES, as suggested by Fig. 2A, B, the anchor remodeling and the DRM association of GPI-anchored proteins should not be affected in the absence of the p24 complex.

Thus, we examined whether remodeling is influenced by the *emp24Δ* mutation. As shown in Fig. 3A, we confirmed that the p24 complex is not required for anchor remodeling. Next, we investigated whether the GPI-anchored proteins become detergent insoluble at the ER in the absence of the p24 proteins, by using the *sec31-1* thermosensitive allele and performing a pulse-chase experiment at restrictive temperature. DRM association of labeled proteins was monitored by the acquisition of detergent insolubility by subjecting cell extracts to incubation with TX-100 and density gradient centrifugations. In *sec31-1* cells, the ER form of the GPI-anchored protein Gas1p was enriched in the fractions corresponding to DRMs (Fig. 3B). As expected, Gas1p derived from *bst1Δ sec31-1* cells was entirely located in the detergent-soluble fractions, verifying that remodeling is essential for DRM isolation of GPI-anchored proteins. However, in *emp24Δ sec31-1* cells, there was no significant difference in the amount of Gas1p associated with DRMs compared to *sec31-1* cells (Fig. 3B). These results indicate that the p24 complex is not required for the isolation of GPI-anchored proteins in DRMs.

Because cargo-coat adaptors are thought to target secretory proteins to the ERES and GPI-anchored proteins are sorted from non-GPI-anchored proteins into different ERES upon cargo concentration, we next investigated whether the p24 complex is required for GPI-anchored protein sorting and targeting into their specific ERES. To test this possibility, we analyzed the co-localization of Cwp2p and the transmembrane protein Hxt1p contained in ERES in *sec31-1* and *emp24Δ sec31-1* cells at 37°C (Fig. S2A, B). No significant differences could be observed, suggesting that sorting upon cargo concentration at ERES is not affected by the *emp24* mutation.

Altogether, the data presented in the previous paragraphs show that sorting and concentration of GPI-anchored proteins at ERES does not depend on p24 proteins, supporting the idea that the p24 complex does not act as a conventional coat-cargo adaptor. Therefore, the export function by which the p24 complex promotes the ER exit of GPI-anchored proteins must be subsequent to their concentration at ERES.

The p24 complex exhibits differential binding affinity towards GPI-anchored proteins depending on anchor remodeling

The crosslinking results show that Emp24p binds specifically GPI-anchored proteins through their GPI anchors. On other hand, our data presented above suggest that the export function of the p24 complex takes place after remodeling and concentration of GPI-anchored proteins at ERES. Therefore, we hypothesized that the p24 complex can interact with GPI-anchored proteins once their GPI anchors have been completely remodeled. To address this issue we explored the dynamics of association between Emp24p and GPI-anchored proteins in wild type and the anchor remodeling mutant *bst1Δ* using a pulse-chase approach. Aliquots of pulse-labeled cells were collected at two different time points during the chase and subjected to a cross-linking study. The radiolabeled cross-linked material was immunoprecipitated with antibody against Emp24p, then reprecipitated with antibody against the GPI-anchored protein Gas1p, analyzed by SDS-PAGE and visualized using a PhosphorImager. This experimental approach lets us to assess and compare the binding affinity of Emp24p towards remodeled with unremodeled GPI-anchored proteins during the biosynthetic transport along the secretory pathway. As shown in Fig. 4, in the wild type strain just immediately after a short (5 min) pulse labeling, newly synthesized Gas1p molecules associate very efficiently to Emp24p in the ER, as indicated by the presence of the 105-kDa precursor form of Gas1p. However, after 30 min of chase, interaction between Emp24p and the 125-kDa mature form of Gas1p was not observed, suggesting that GPI-anchored proteins dissociate from Emp24p upon arrival to the Golgi. Next we assessed the association of Emp24p with Gas1p in the *bst1Δ* mutant, which imposes a specific ER-to-Golgi transport defect for GPI-anchored proteins (Tanaka *et al.*, 2004). We found that at the beginning of the chase (0 min time point), Emp24p can be crosslinked to the ER precursor form of Gas1p but around three times less efficiently than in wild type. Nevertheless, this interaction of Emp24p with unremodeled GPI-anchored proteins is specific, since CPY was not crosslinked, and persisted within the ER after 30 min of chase (Fig. 4).

These results indicate that the p24 complex recognizes preferentially remodeled GPI-anchored proteins, which reinforces the idea that the p24 complex promotes the efficient export of GPI-anchored proteins after their remodeling and concentration at ERES. Furthermore, they also show that the association between p24 proteins and remodeled GPI-anchored proteins is transient since it is lost upon their transport to the Golgi complex. In contrast, although weaker, the specific binding of Emp24p with unremodeled GPI-anchored proteins is prolonged and stabilized in the ER. This result prompted us to evaluate whether the lower binding affinity of Emp24p towards unremodeled GPI-anchored proteins plays any physiological role in the biosynthetic transport of GPI-anchored proteins.

A defect in GPI anchor remodeling specifically traps the p24 complex at the ER.

We have shown previously that anchor remodeling is required for the efficient ER exit of GPI-anchored proteins (Castillon *et al.*, 2009). Indeed, the disruption of the genes encoding remodeling enzymes, including the inositol deacylase Bst1p or the GPI phospholipase Per1p, lead to the ER accumulation of unremodeled GPI-anchored proteins. This accumulation is specific since the unrelated transmembrane cargo Hxt1p is properly targeted to the plasma membrane in the absence of remodeling (Fig. 5A, B and (Castillon *et al.*, 2009)). Since Emp24p is able to interact stably with unremodeled GPI-anchored proteins in the ER (Fig. 4), we decided to investigate whether the ER accumulation of unremodeled GPIAPs observed in the remodeling mutants could influence the intracellular localization of Emp24p, which normally cycles between Golgi and ER compartments (Belden and Barlowe, 2001). To address this possibility, we analyzed the Emp24p localization in the absence of remodeling by using the *bst1Δ* and *per1Δ* mutant strains. In wild type cells Emp24p is preferentially found in dot-like structures that colocalize with the *cis*-Golgi SNARE Sed5p (Fig.5C), whereas in both *bst1Δ* and *per1Δ* mutant cells it is completely relocated to the ER (Fig. 5D, E). This relocation phenotype could be explained if the p24 complex is unstable in the absence of remodeling and thus the p24 proteins would be subsequently retained in the ER. However, we examined this possibility and we found that the p24 complex is indeed stable and presumably functional in the remodeling mutants (Fig.S3). Therefore, we assume that the relocation and ER retention of Emp24p observed in remodeling mutants are due to the interaction of Emp24p with the anchor of the GPI-anchored proteins. If this hypothesis is correct, Emp24p normal localization should not be affected in the absence of GPI anchor synthesis. We tested this assumption by analyzing the localization of Emp24p in the *gpi1Δ* mutant. Gpi1p is involved in the synthesis of the GPI

anchor (Leidich and Orlean, 1996). Defect in this process prevents efficient GPI anchoring and therefore leads to the ER accumulation of the membrane associated precursors (Fig. 5A, B). As predicted, in the *gpi1Δ* mutant such precursor accumulation does not affect the localization of Emp24p, which is not trapped at the ER and can be properly sent off to the Golgi. (Fig. 5D, E). This shows that an unremodeled GPI anchor is required to cause redistribution of Emp24p to the ER.

Next, we investigated whether Emp24p also fails to be incorporated into ERES in remodeling mutants. To assess this possibility, we analyzed the distribution of Emp24p in the *bst1Δ sec31-1* mutant strain at 37°C. As shown (Fig. 5F, G) Emp24p is preferentially found in ERES in *sec31-1* cells. Nevertheless, in a *bst1Δ sec31-1* cells Emp24p did not show the typical ERES punctuate pattern, displaying only the ER-characteristic nuclear ring staining. The defect in ERES association is specific for Emp24p because Erv14p, a transmembrane protein that also cycles continuously between ER and Golgi (Powers and Barlowe, 1998), is properly accumulated at ERES in the *bst1Δ sec31-1* mutant cells (Fig. 5F, G). Therefore, this result indicates that the ER accumulation of unremodeled GPI-anchored proteins prevents the p24 complex from being incorporated into ERES.

The p24 complex contributes to the effective ER retention of unremodeled GPI-anchored proteins.

Taken together, the data presented in the previous paragraphs may suggest a role of the p24 complex in the quality control of GPI-anchored proteins. The p24 complex might contribute to the retention of GPI-anchored proteins in the ER until they become properly remodeled. We have addressed this possibility by checking whether the unremodeled GPI-anchored proteins can be transported faster in the absence of the p24 complex. To do this we analyzed by a pulse-chase experiment the ER-to-Golgi transport of Gas1p in remodeling mutants lacking Emp24p (Fig. 6A, B). Compared to wild type strain the Golgi maturation kinetics of Gas1p is delayed in the *emp24Δ* mutant and the remodeling mutant *bst1Δ*, as observed previously (Schimmoller *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2004). Nevertheless, the delay is stronger in the remodeling mutant than in the *emp24Δ* mutant strain. Remarkably, in the double mutant *emp24Δ bst1Δ* the transport rate is improved with respect to the single remodeling mutant. Therefore, this result clearly shows that the p24 complex contributes to the ER retention of unremodeled GPI-anchored proteins,

supporting the idea that the p24 complex is involved in a quality control mechanism that regulates the intracellular transport of GPI-anchored proteins.

The p24 complex alleviates the ER stress caused by the accumulation of unremodeled GPI-anchored proteins.

To confirm the quality control function of the p24 complex in the fidelity of GPI-anchored proteins, we examined the effect of the p24 proteins on the multifaceted unfolded protein response (UPR) in the absence of remodeling. The UPR has been shown to alleviate the stress produced by the accumulation of aberrant secretory cargo in the ER (Travers *et al.*, 2000). Indeed, under normal growth conditions, a defect in remodeling causes the ER accumulation of unremodeled GPI-anchored proteins, which results in constitutive and moderate activation of the UPR (Jonikas *et al.*, 2009). If the p24 complex contributes to the quality control by binding unremodeled GPI-anchored proteins in the ER, the absence of the p24 proteins in a remodeling mutant should further activate the UPR. To address this possibility, we measured the UPR induction from a reporter construct (pJC31) that contains the 22-bp *UPRE* (unfolded protein responses element) of *KAR2* fused to *LacZ* (Cox and Walter, 1996). β -galactosidase activity was increased in the *emp24 Δ bst1 Δ* double mutant compared with the single mutants (Fig. 7), reflecting a synergistic activation of the UPR. Therefore, this result strongly supports a role of the p24 complex in the ER quality control of GPI-anchored proteins.

Discussion

In eukaryotic cells, a stringent quality control system monitors protein folding and assembly to ensure that only properly folded and assembled secretory cargo can be delivered to their final destinations (Ellgaard and Helenius, 2003). In this paper, we report a novel quality control mechanism that specifically regulates the intracellular transport of GPI-anchored proteins by monitoring the proper glycolipid anchor remodeling in yeast. Crosslinking experiments show that Emp24p can interact with unremodeled GPI-anchored proteins. In remodeling mutants, Emp24p and GPI-anchored proteins are specifically trapped in the ER. Unremodeled GPI-anchored proteins are transported more efficiently in the absence of Emp24p. Moreover, the UPR is synergistically enhanced under these conditions. Based on these findings, we propose that the yeast p24 complex has a new specific role in quality control of GPI-anchored proteins, retaining them at the ER until they are correctly remodeled.

p24 proteins have been previously suggested to play an unspecific role in protein quality control by acting as “placeholders” to restrict indirectly the entry of ER residents or unfolded proteins into COPII vesicles (Elrod-Erickson and Kaiser, 1996; Springer *et al.*, 2000). In contrast to this passive function, we propose here an active mechanism by which the p24 proteins are specifically involved in the quality control of the GPI-anchored protein family. However, the two mechanisms are not necessarily mutually exclusive. In particular, we provide evidence suggesting that the p24 complex binds and retains selectively unremodeled GPI-anchored proteins in the ER. The retention mechanism seems to involve GPI anchor recognition by the p24 complex. Consistent with this idea, Emp24p can bind Gas1p but not to Gas1-TMD or Gas1Q, for which the GPI attachment signal has been exchanged to a transmembrane domain or mutated in the ω -site to prevent anchoring, respectively. Moreover, Emp24p localization is strongly affected by the presence of unremodeled GPI-anchored proteins, but not when anchor synthesis is defective as seen in *gpi1Δ* cells. One possibility is that Emp24p recognizes the lipid moiety on the GPI anchor. Supporting this, some mammalian p24 proteins have been found to interact with specific lipid species (F Wieland, personal communication, 2010). Alternatively or additionally, Emp24p might interact with the glycan backbone of the GPI anchor. These possibilities will be addressed in further studies.

The active role of the p24 complex in the ER retention of unremodeled GPI-anchored proteins through binding to them can be explained in two ways. First, the p24 complex could directly prevent the efficient ER exit of unremodeled GPI-anchored proteins. However, this possibility seems to be unlikely since unremodeled GPI-anchored protein concentration at ERES is not recovered in the absence of the p24 proteins (data not shown). Alternatively, the ER retention of unremodeled GPI-anchored proteins by the p24 complex may involve retrieval from Golgi. The p24 complex could bind unremodeled GPI-anchored proteins in the ER, travel with them to the cis-Golgi and mediate their efficient recycling to the ER via COPI-dependent retrograde transport pathway. Consistent with a retrieval action, we observed a complete redistribution of Emp24p from Golgi to ER when remodeling is defective. Likewise, the mammalian KDEL receptor with steady state in the cis-Golgi compartment also redistributes to the ER upon overexpression of KDEL-bearing secretory proteins (Lewis and Pelham, 1992). Additionally, several characteristics make p24 proteins a suitable retrograde carrier for recovering escaped unremodeled GPI-anchored proteins. The efficient coatomer binding ensures a major presence of p24 proteins in COPI-coated vesicles and, consequently, allows their continuous recycling from Golgi to the ER (Stamnes *et al.*, 1995; Sohn *et al.*, 1996; Belden and Barlowe, 2001). Moreover, p24 proteins are not simply passive COPI vesicle travelers. Instead, they play an active role in retrograde transport by facilitating the formation of COPI-coated vesicles from the Golgi membrane (Aguilera-Romero *et al.*, 2008). This general function of p24 complex promoting retrograde transport would further improve the specific recycling of unremodeled GPI-anchored protein to the ER.

In addition to the particular role of the yeast p24 complex in quality control of GPI-anchored proteins, this study provides relevant mechanistic insights concerning its ER export function. Our previous observations suggested that the p24 complex might act as a cargo-coat adaptor for GPI-anchored proteins by coupling luminal cargo selection with coat assembly (Muniz *et al.*, 2000). However, we show here that although p24 complex binds specifically to all GPI-anchored proteins tested in the ER in an anchor-dependent manner, it is not required to sort and concentrate them into their specific ERES. This implies that the p24 complex does not behave as predicted for a conventional cargo-coat adaptor and, more importantly, that its ER export function must take place downstream of cargo concentration. Consistently, GPI-anchored protein concentration at ERES depends upon anchor remodeling but does not require COPII assembly (Castillon *et al.*, 2009). Moreover, the higher binding of Emp24p to remodeled GPI-anchored proteins strongly supports that the p24 complex functions after remodeling and concentration at ERES. One possibility is that p24 complexes are recruited to the previously

formed GPI-anchored protein ERES, from where they facilitates COPII vesicle budding. Given their ability to interact with the COPII components, p24 complexes could create binding sites for COPII coat on these specific ERES and thus promote vesicle biogenesis. In support of this idea, a similar mechanism is thought to act for the generation of COPI vesicles, in which the yeast p24 proteins can promote budding by acting as a primer to induce COPI coat polymerization onto the Golgi membrane (Aguilera-Romero *et al.*, 2008). Furthermore, p24 tails from animal cells can stimulate *in vitro* the formation of COPI-coated vesicles when they are displayed on liposomes (Bremser *et al.*, 1999).

In summary, regarding the specific trafficking of GPI-anchored proteins along the early secretory pathway, the yeast p24 complex acts as an escort with a dual role. First, the p24 complex would promote the efficient ER exit of fully remodeled GPI-anchored proteins by facilitating budding from their specific ERES. In addition, it would prevent the progression of unremodeled GPI-anchored proteins along the secretory pathway most likely by recycling them from Golgi to the ER. This dual role can be explained by the differential binding affinity that p24 complex exhibits towards the unremodeled and remodeled forms of GPI-anchored proteins. Indeed, preferential binding of the p24 complex to fully remodeled GPI-anchored proteins could ensure that the p24 complex only interacts efficiently with those GPI-anchored proteins ready to be exported from ER, preventing premature binding that could compete with the remodeling machinery and, thereby, interfering with correct anchor processing. Nevertheless, when GPI-anchored proteins are not correctly processed by the remodeling machinery, the p24 complex weaker binding to unremodeled GPI-anchored proteins is sufficiently effective to achieve their ER retention. Therefore, by sensing the status of the anchor the p24 complex could regulate GPI-anchored protein intracellular transport and coordinate this with correct anchor remodeling.

This study further supports an intimate connection between the ER export machineries and the quality control at the early secretory pathway. Thus, our findings are in light with several studies suggesting that specialized export factors contributes to the overall ER quality control of their specific secretory cargoes (Dancourt and Barlowe, 2010). Further experimentation will be necessary to determine the exact mechanism by which p24 proteins control the fidelity of GPI-anchored protein transport along the early secretory pathway.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación BFU2008-04119/BMC (to M Muñiz), Swiss National Science Foundation (to H Riezman and R Watanabe), an SNSF Assistant Professorship (R Watanabe), and University of Seville fellowships (to A Aguilera-Romero and J Manzano). Imaging was carried out at the Imaging Platform of the NCCR Frontiers in Genetics. We thank Christoph Bauer for his assistance with imaging, Brigitte Bernadets for technical assistance, and Veit Goder and Anne Spang for materials and advice.

References

- Aguilera-Romero, A., Kaminska, J., Spang, A., Riezman, H., and Muniz, M. (2008). The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *J Cell Biol* 180, 713-720.
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., and Simons, K. (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3254-3259.
- Belden, W.J., and Barlowe, C. (1996). Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem* 271, 26939-26946.
- Belden, W.J., and Barlowe, C. (2001). Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J Biol Chem* 276, 43040-43048.
- Bonnon, C., Wendeler, M.W., Paccaud, J.P., and Hauri, H.P. (2010). Selective export of human GPI-anchored proteins from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 123, 1705-1715.
- Bremser, M., Nickel, W., Schweikert, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Hughes, C.A., Sollner, T.H., Rothman, J.E., and Wieland, F.T. (1999). Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* 96, 495-506.
- Caro, L.H., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1997). In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1477-1489.
- Castillon, G.A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T.M., and Riezman, H. (2009). Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* 10, 186-200.
- Cox, J.S., and Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* 87, 391-404.

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

Elrod-Erickson, M.J., and Kaiser, C.A. (1996). Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol Biol Cell* 7, 1043-1058.

Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191.

Fujita, M., and Jigami, Y. (2008). Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. *Biochim Biophys Acta* 1780, 410-420.

Fujita, M., Umemura, M., Yoko-o, T., and Jigami, Y. (2006). PER1 is required for GPI-phospholipase A2 activity and involved in lipid remodeling of GPI-anchored proteins. *Mol Biol Cell* 17, 5253-5264.

Fullekrug, J., Saganuma, T., Tang, B.L., Hong, W., Storrie, B., and Nilsson, T. (1999). Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members. *Mol Biol Cell* 10, 1939-1955.

Gentzsch, M., and Tanner, W. (1997). Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* 7, 481-486.

Ghugtyal, V., Vionnet, C., Roubaty, C., and Conzelmann, A. (2007). CWH43 is required for the introduction of ceramides into GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 65, 1493-1502.

Guillas, I., Pfefferli, M., and Conzelmann, A. (2000). Analysis of ceramides present in glycosylphosphatidylinositol anchored proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 312, 506-515.

Jonikas, M.C., Collins, S.R., Denic, V., Oh, E., Quan, E.M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J.S., and Schuldiner, M. (2009). Comprehensive

characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 323, 1693-1697.

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

Leidich, S.D., and Orlean, P. (1996). Gpi1, a *Saccharomyces cerevisiae* protein that participates in the first step in glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem* 271, 27829-27837.

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

Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.

Maeda, Y., Tashima, Y., Houjou, T., Fujita, M., Yoko-o, T., Jigami, Y., Taguchi, R., and Kinoshita, T. (2007). Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association. *Mol Biol Cell* 18, 1497-1506.

Marzioch, M., Henthorn, D.C., Herrmann, J.M., Wilson, R., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., Solari, R.C., and Rowley, A. (1999). Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol Biol Cell* 10, 1923-1938.

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

Mayor, S., and Riezman, H. (2004). Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 110-120.

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

Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P., and Riezman, H. (2000). The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol* 148, 925-930.

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

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

Pittet, M., and Conzelmann, A. (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1771, 405-420.

Powers, J., and Barlowe, C. (1998). Transport of axl2p depends on erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila* cornichon gene product. *J Cell Biol* 142, 1209-1222.

Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B., and Piston, D.W. (2004). An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 22, 445-449.

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

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

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

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

Springer, S., Chen, E., Duden, R., Marzioch, M., Rowley, A., Hamamoto, S., Merchant, S., and Schekman, R. (2000). The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4034-4039.

Stamnes, M.A., Craighead, M.W., Hoe, M.H., Lampen, N., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1995). An integral membrane component of coatamer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8011-8015.

Takida, S., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2008). Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane. *Biochem J* 409, 555-562.

Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y., and Kinoshita, T. (2004). Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. *J Biol Chem* 279, 14256-14263.

Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101, 249-258.

Watanabe, R., Castillon, G.A., Meury, A., and Riezman, H. (2008). The presence of an ER exit signal determines the protein sorting upon ER exit in yeast. *Biochem J.* 414(2):237-45

Fig. 1

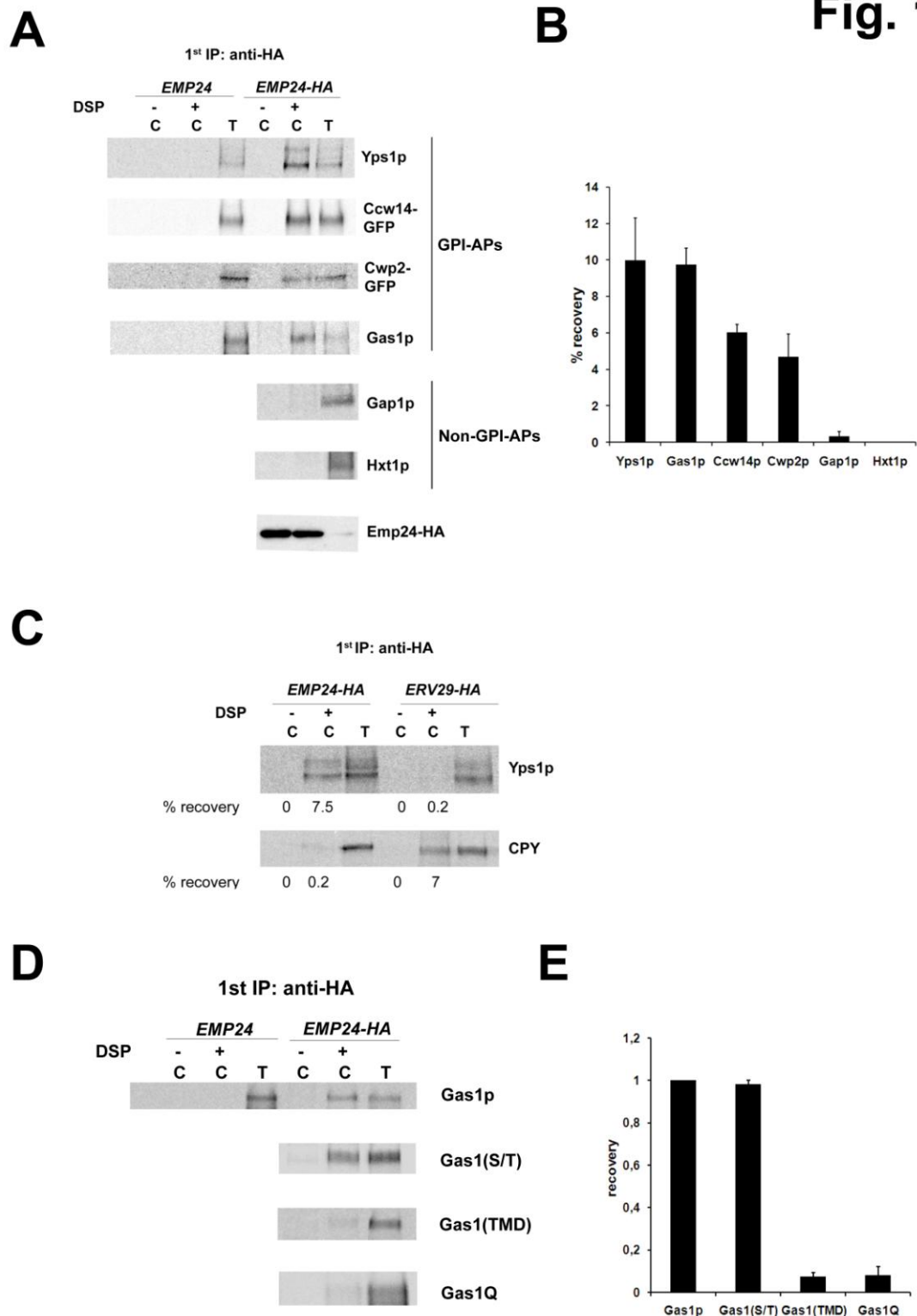


Figure 1. The p24 complex associates specifically with the GPI-anchored proteins through the GPI anchor. (A) Emp24p can be cross-linked specifically to GPI-anchored proteins in the ER.

Pulse-radiolabelled yeast cells from *EMP24-HA*-tagged and untagged strains were converted to perforated spheroplasts and incubated with (+) and without (-) DSP. The samples were denatured and immuno-precipitated with anti-HA antibody and re-precipitated with antibody against GPI-anchored proteins or non-GPI-anchored proteins [C]. 5% of the DSP exposed spheroplasts were immuno-precipitated with antibodies against GPI-anchored proteins or non-GPI-anchored proteins to use as a standard [T] for recovery. Samples were incubated with 5% 2- β -mercaptoethanol, analyzed by SDS-PAGE, and visualized using a PhosphoImager. Emp24-HA was detected by immuno-blot. (B) Quantification of several experiments described in (A). The graph plots the average percentage of the recovery of different secretory proteins. (C) Erv29p can be crosslinked to CPY but not to GPI-anchored proteins. Spheroplasts obtained from Emp24-HA and Erv29-HA strains were incubated with (+) or without (-) DSP, denatured, immunoprecipitated with anti-HA antibody, then reprecipitated with antibody against the Yps1p or CPY and processed as above. The percent recovery of cross-linked Yps1p and CPY is shown. (D) Emp24p can be crosslinked to GPI-anchored proteins through the GPI anchor. Spheroplasts obtained from Emp24-HA cells expressing different constructs of the Gas1p were treated with (+) or without (-) DSP denatured, immunoprecipitated with anti-HA antibody, then reprecipitated with antibody against the Gas1p and processed as above. (E) Quantification of several experiments described in (D). The graph plots the average percentage of the recovery of different Gas1p mutant constructs normalized relative to the recovery of Wild-type Gas1p.

Fig. 2

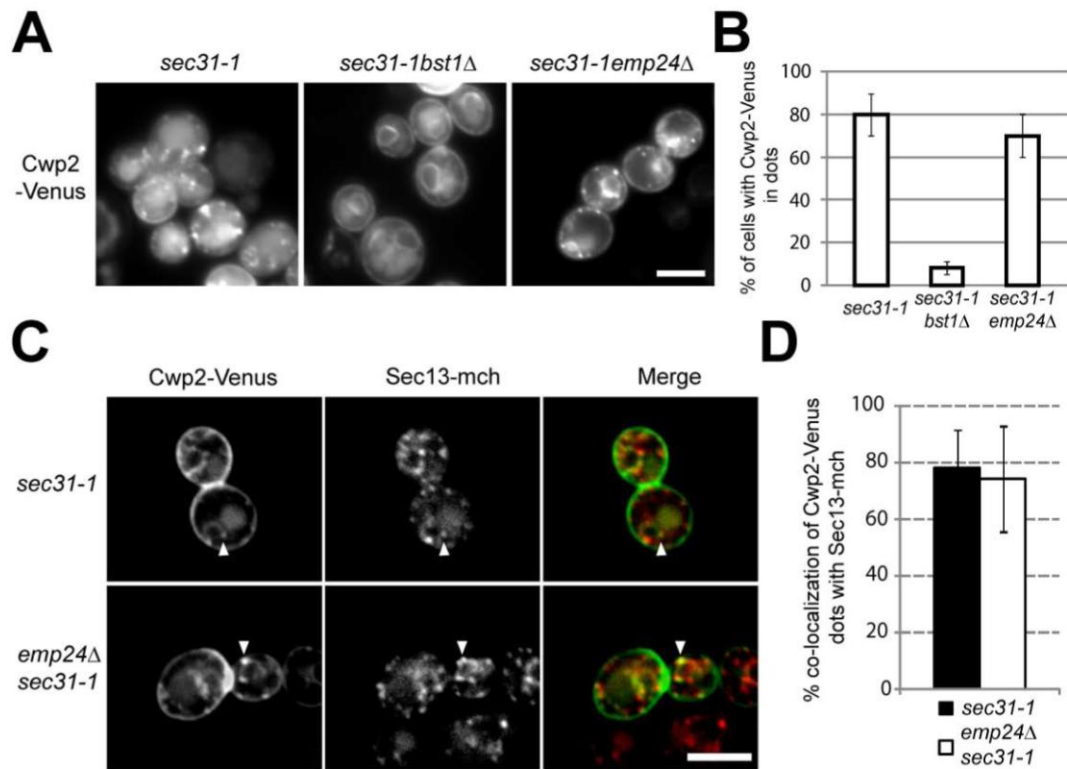


Figure 2. Emp24p is not required for GPI-anchored cargo sorting and concentration into ERES. (A) Fluorescent micrographs of live *sec31-1*, *sec31-1 bst1Δ* and *sec31-1 emp24Δ* cells expressing Cwp2-Venus at 37°C. Raw images. (B) Quantification of several micrographs described in (A). The graph plots the average percentage of the *sec31-1*, *sec31-1 bst1Δ* and *sec31-1 emp24Δ* cells, for which Cwp2-Venus is found in dot-like structures. n=number of cells plotted, $74 \leq n \leq 89$. (C) Fluorescent micrographs of live *sec31-1* and *sec31-1 emp24Δ* cells expressing Cwp2-Venus (green) and Sec13-mCh (red) at 37°C. White arrow heads: co-localizing dots. Deconvoluted images by 10 iterations. (D) Quantification of several micrographs described in (C). The graph displays the means of the percentage of co-localization per cell of Cwp2-Venus dots with Sec13-mCh dots in *sec31-1* (black bars, n=36) and in *sec31-1 emp24Δ* (white bars, n=55). (A, D) Scale bar: 5 μ m.

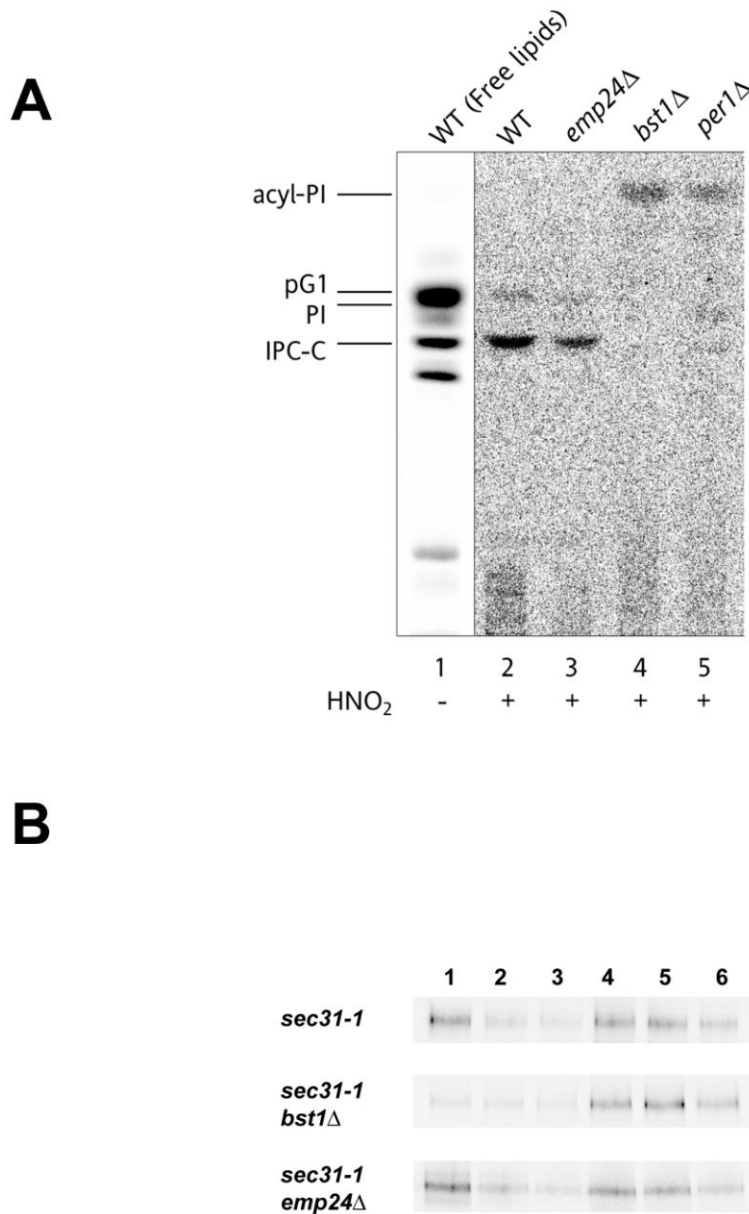
Fig. 3

Figure 3. The p24 complex is not required for anchor remodeling or DRM partition of GPI-anchored proteins in the ER. (A) Lipid remodeling of the GPI anchor is normal in *emp24Δ* cells. Wild-type, *emp24Δ*, *bst1Δ* and *per1Δ* strains were labeled with [³H] myo-inositol for 2 hr at 25°C. The labeled PI moieties were prepared from GPI-anchored proteins, and analyzed by TLC using solvent system (55:45:10 chloroform-methanol-0.25% KCl). Lipids extracted from wild-type cells (lane 1) were used as a standard. pG1, phosphatidylinositol with a C26:0 fatty acid in sn-2 position; PI, phosphatidylinositol; IPC-C, inositolphosphorylceramide consisting of phytosphingosine and a hydroxylated C26:0 fatty acid {Fujita, 2006 #90}; acyl-PI, inositol-

acylated PI {Ghugtyal, 2007 #99} (B) GPI-anchored proteins are associated with DRMs at the ER level in *emp24Δ* cells. DRM association of the Gas1p in the ER was analyzed using *sec31-1*, *sec31-1 bst1Δ* and *sec31-1 emp24Δ* cells, which were previously pulse-labeled and chased at 37°C. The cells were broken with glass beads, subjected to TX-100 extraction and density gradient centrifugation. Six fractions were collected and analyzed by immunoprecipitation with antibodies against Gas1p; fraction 1 corresponding to the top of the gradient and fraction 6 to the bottom.

Fig. 4

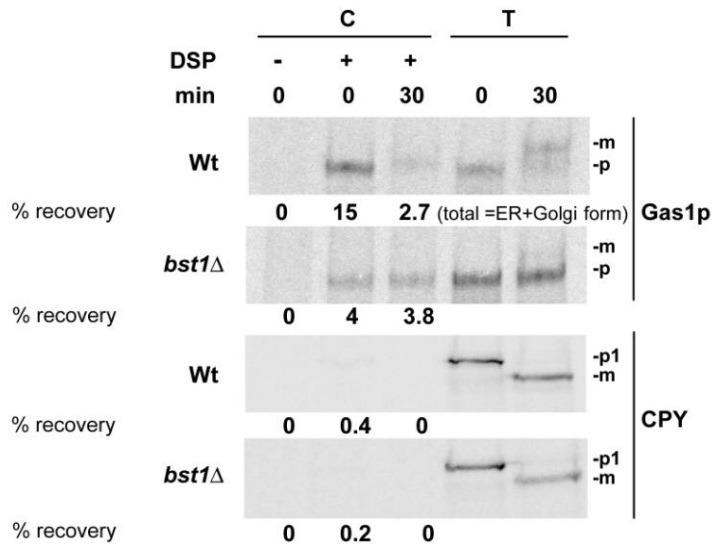


Figure 4. Emp24p displays different binding affinities towards remodeled and unremodeled GPI-anchored proteins. Crosslinking between Emp24p and Gas1p during biosynthetic transport in wild-type and *bst1Δ* mutant strains. Proliferating cells were radiolabeled for 5 min, chased for the indicated times at 24°C. Spheroplasts from wild type or *bst1Δ* mutant pulse-chased cells were incubated with (+) and without (-) DSP, denatured, immunoprecipitated with anti-Emp24p antibody, then reprecipitated with antibody against Gas1p or CPY [C]. 10% of the DSP exposed spheroplasts were immuno-precipitated with antibodies against Gas1p or CPY to use as a standard [T] for recovery. Samples were processed as in Fig. 1A. Gas1p: p, ER-precursor form; m, Golgi form. CPY: p1, ER-precursor form; m, mature form. The percent recovery of cross-linked Gas1p is shown.

Fig. 5

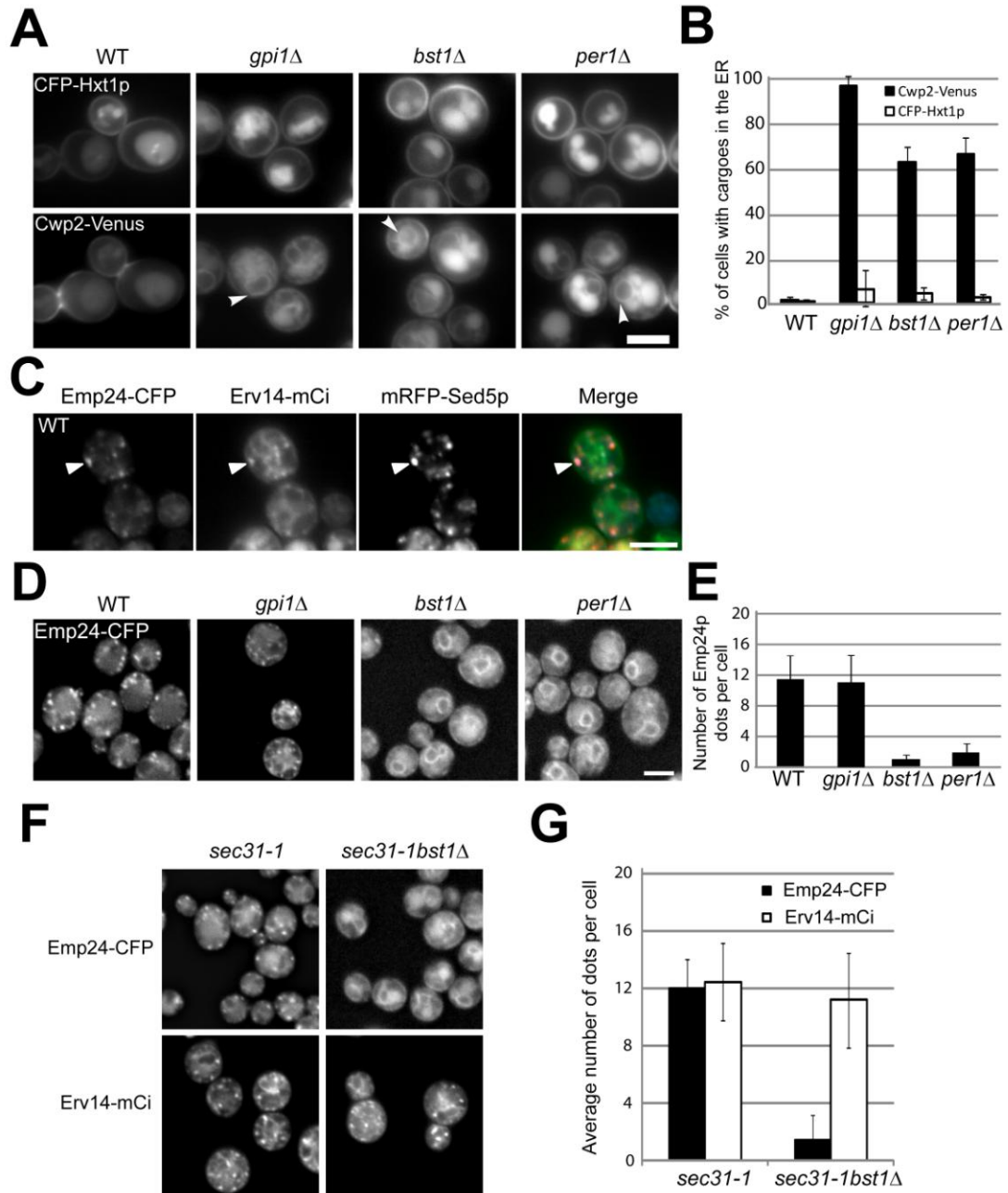
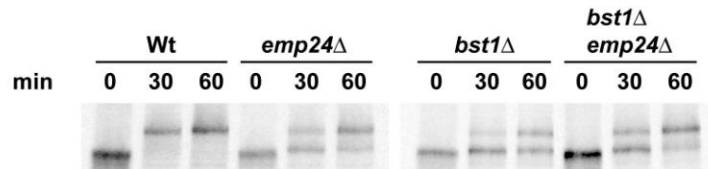


Figure 5. Emp24p and GPI-anchored proteins are specifically trapped at the ER in remodeling mutants. (A) Selective defect in the ER export of GPI-anchored proteins in remodeling mutants. Live images of wild-type, *gpi1* Δ , *bst1* Δ , *per1* Δ expressing Hxt1-CFP and Cwp2-Venus at 30°C. (B) Quantification of several micrographs described in (A). The graph plots the average percentage of cells displaying Cwp2-Venus (black bars) and Hxt1-CFP (white bars) in the ER.

37≤n≤53. (C) Live images of WT cells expressing Emp24-CFP, Erv14-mCi and mRFP-Sed5 at 30°C. (D) Emp24p localization depends on remodeling of GPI-anchored proteins. Live images of wild-type, *gpi1Δ*, *bst1Δ*, *per1Δ* cells expressing Emp24-CFP at 30°C. (E) Quantification of several micrographs described in (D). The graph plots the average number of Emp24-CFP dots per cell seen in the different strains. n=number of cells plotted, 46≤n≤63. (F) Emp24p is not incorporated at ERES in remodeling mutants. Fluorescent micrographs of live *sec31-1* and *sec31-1 bst1Δ* cells expressing Emp24-CFP and Erv14-mCi at 37°C. (G) Quantification of several micrographs described in (F). The graph plots the average percentage of the *sec31-1* and *sec31-1 bst1Δ* cells, for which Emp24-CFP and Erv14-mCi are found in dot-like structures. n=number of cells plotted, 74≤n≤89. (A, C, D, F) Raw images. Scale bar: 5 μm.

Fig. 6

A



B

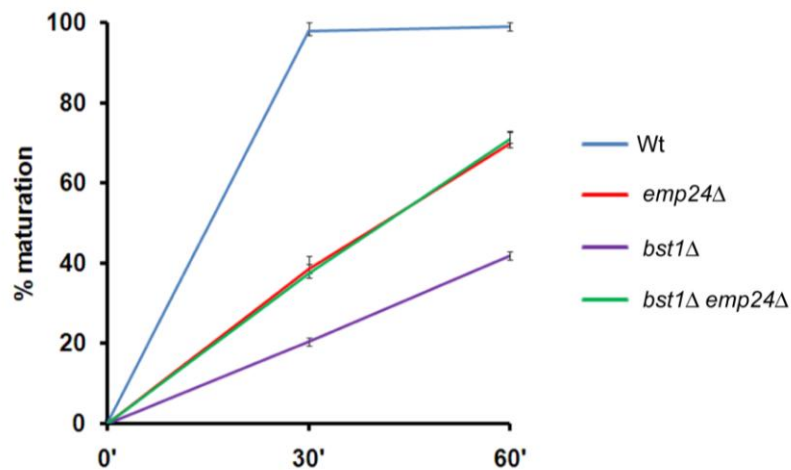


Figure 6. The *emp24Δ* mutation partially suppresses the GPI-anchored protein transport defect in remodeling mutants. (A) Pulse-chase analysis to follow the transport from ER to Golgi of Gas1p in wild-type and deletion strains. Proliferating cells were radiolabeled for 5 min, chased for the indicated times at 24°C, and lysed. Gas1p was immunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by PhosphoImager. ER (p), Golgi (m) Gas1p forms are indicated. (B) Quantification of several experiments described in (A). The graph plots the average percentage of Gas1p maturation in wild-type and deletion strains.

Fig. 7

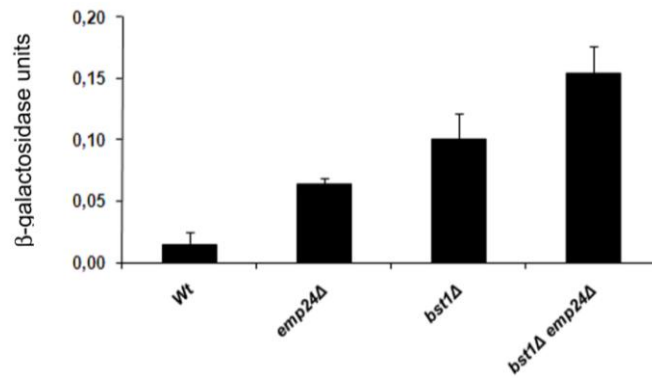


Figure 7. Deletion of *EMP24* in the absence of remodeling increases activation of the UPR. β -galactosidase assays were performed on strains harboring the reporter construct (pJC31). Activity is given in β -galactosidase units and represents the average of four independent determinations with SE.

Fig. 8

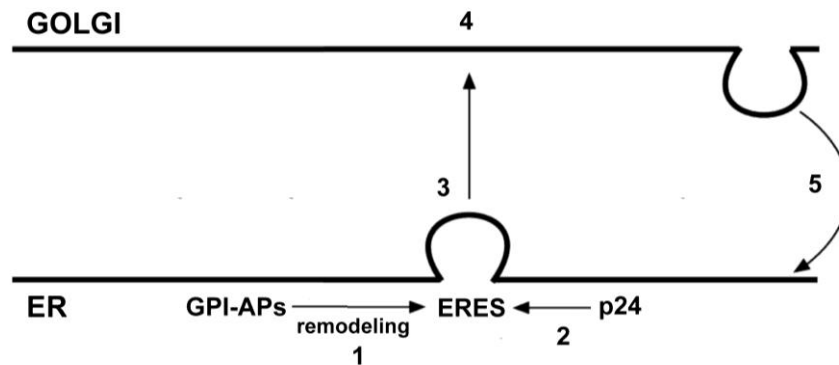


Figure 8. Model of the specific roles of the p24 complex in the trafficking of GPI-anchored proteins along the early secretory pathway. The p24 complex promotes the efficient ER export of fully remodeled GPI-anchored proteins by facilitating COPII budding from their specific ERES and prevents the progression of incompletely remodeled GPI-anchored proteins along the secretory pathway by recycling them back from Golgi to the ER. 1-GPI anchored proteins are concentrated and sorted into their specific ERES upon anchor remodeling. 2- p24 complex is efficiently recruited to these ERES due to its higher binding affinity towards fully remodeled GPI-anchored proteins. 3- The p24 complex acts as a coat receptor by stabilizing COPII components to the GPI-anchored protein ERES facilitating vesicle biogenesis. 4- During or after arrival to the Golgi, GPI-anchored proteins dissociate from the p24 complex. On their release, correctly remodeled GPI-anchored proteins can progress through the secretory pathway to be finally delivered to the plasma membrane. 5- Escaped unremodeled GPI-anchored proteins are retro-transported from Golgi to the ER by the p24 complex. GPI-APs: GPI-anchored proteins.

Fig. S1

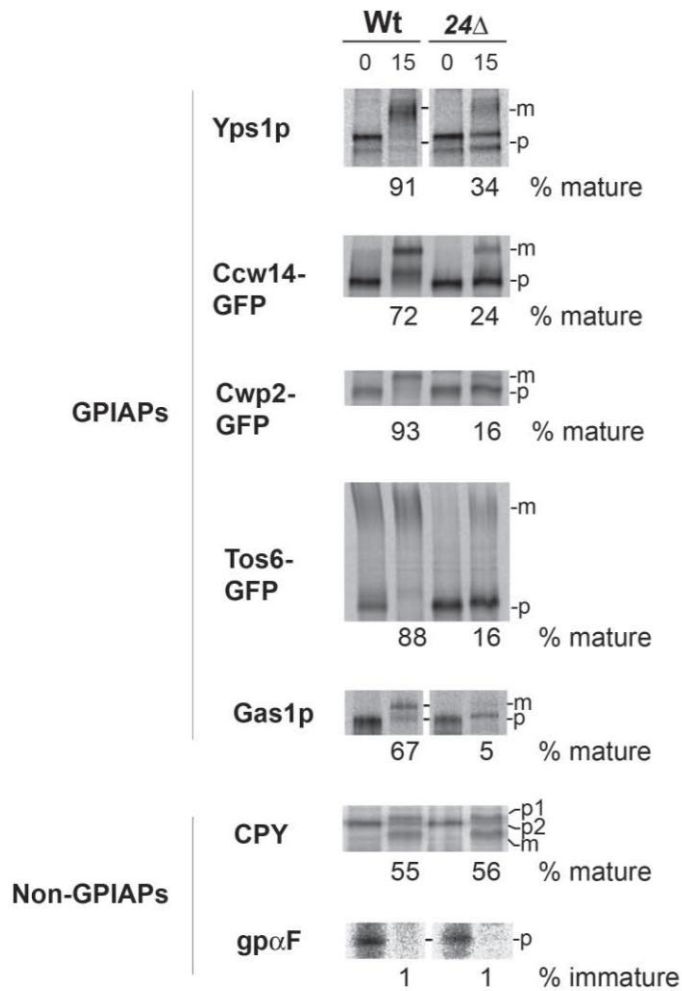


Figure S1. The p24 complex is required for efficient ER exit of GPI-anchored proteins. Pulse-chase analysis of the ER-to-Golgi transport in wild-type and *emp24Δ* strains. Cells were radiolabeled for 5 min, chased for 15 min at 24°C, and lysed. GPI-anchored proteins, CPY and Pre-pro- α -factor were immunoprecipitated, resolved by SDS-PAGE, and analyzed by PhosphoImager. GPI-anchored proteins: p, ER-precursor form; m, Golgi form. CPY: p1, ER-precursor form; p2, Golgi precursor form; m, mature form. Pre-pro- α -factor: p, ER-precursor form.

Fig. S2

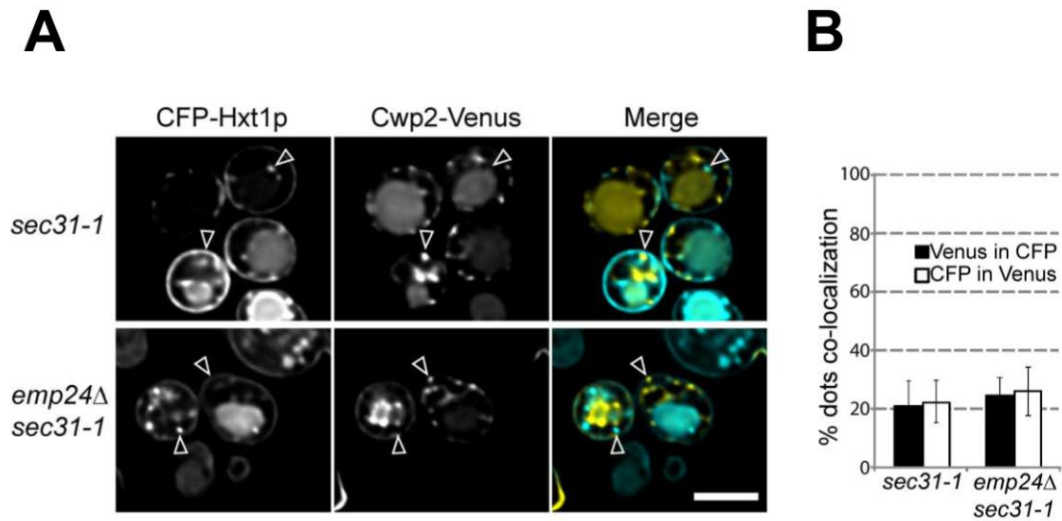


Figure S2. The p24 complex is not required for protein sorting upon ER exit. (A) Fluorescent micrographs of live *sec31-1* and *sec31-1 emp24Δ* cells expressing -Hxt1-CFP (cyan) and Cwp2-Venus (yellow) at 37°C. (B) Quantification of several micrographs described in (A). The graph displays the means of the percentage of co-localization per cell between Cwp2-Venus dots and Hxt1-CFP dots in *sec31-1* (n=47), and in *sec31-1 emp24Δ* (n=58). Images deconvoluted by 10 iterations. Open arrow heads: non co-localizing dots. Scale bar: 5μm.

Fig. S3

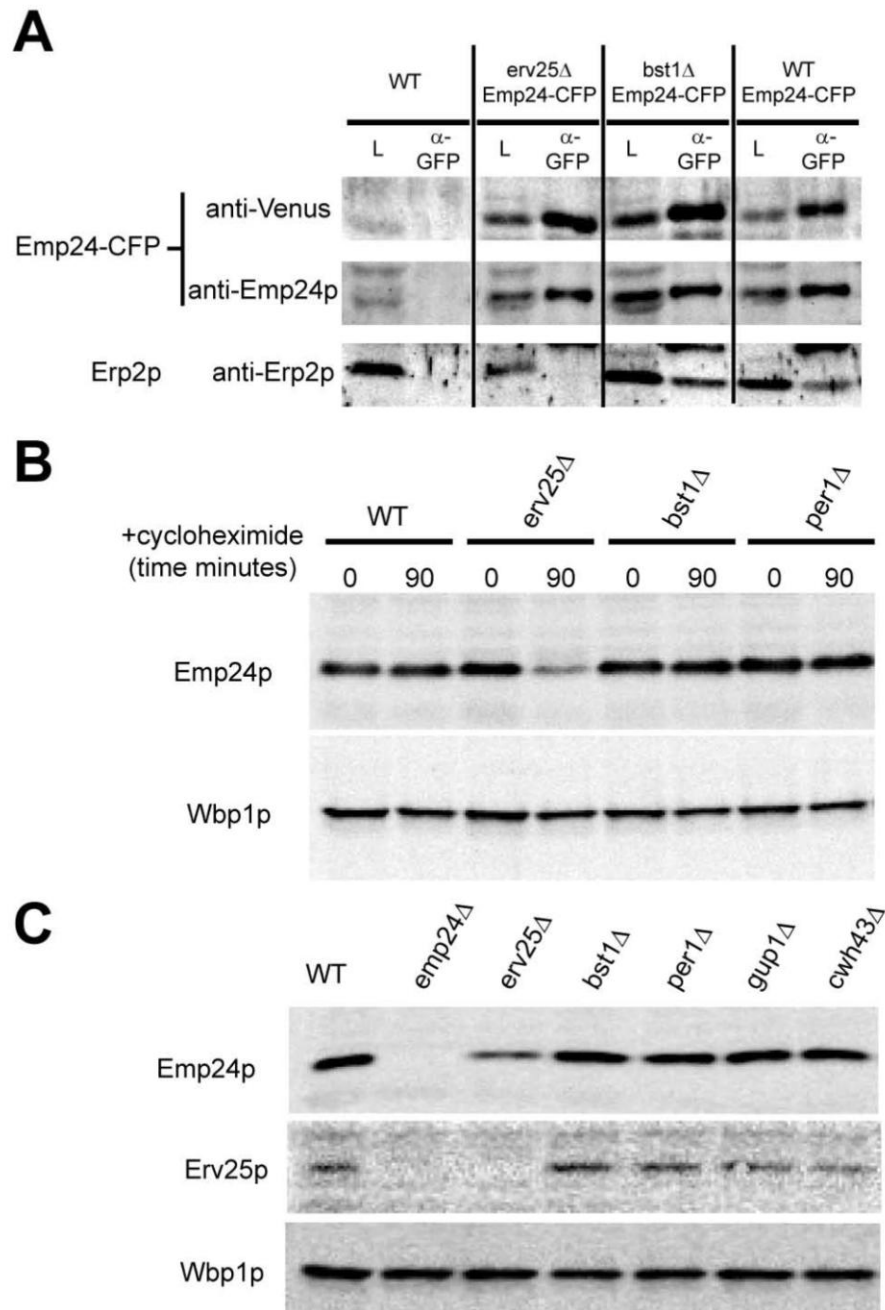


Figure S3. The p24 complex is stable in remodeling mutants. (A) Co-immunoprecipitation of Emp24-CFP with Erp2p in wild-type, *erv25Δ* and *bst1Δ* cells. Lysates (L) were incubated with the monoclonal anti-GFP antibody. (B) Stability of Emp24p after cycloheximide treatment in

wild-type, *erv25Δ*, *bst1Δ* and *per1Δ* cells at 30°C. (C) Protein levels of Emp24p and Erv25p in the remodeling mutants at 37°C.

Table 1. List of the strains used in this study.

<i>Number</i>	<i>Name</i>	<i>Genotype</i>
RH2874	<i>WT</i>	<i>Mat α leu2 lys2 trp1 ura3 bar1</i>
RH6153	<i>erv29Δ</i>	<i>Mat α erv29Δ::KanMX ura3 leu2 lys2 trp1 bar1</i>
RH5698	<i>gpi1Δ</i>	<i>Mat α gpi1::TRP1 ade2 ade3 his3 leu2 trp1 ura3</i>
RH5877	<i>sec31-1</i>	<i>Mat a sec31-1 leu2 ura3 lys2 trp1 his3</i>
RH6878	<i>erv14Δ</i>	<i>Mat a erv14Δ::KanMX leu2 ura3 lys2 trp1</i>
RH6910	<i>emp24Δ</i>	<i>Mat a emp24Δ::KanMX leu2 ura3 lys2 trp1 his3</i>
RH6912	<i>sec31-1 emp24Δ</i>	<i>Mat a sec31-1 emp24Δ::KanMX leu2 ura3 lys2 trp1</i>
RH7016	<i>erv14-mCi</i>	<i>Mat α erv14-mCi-SpHIS5 leu2 ura3 lys2 trp1 his3</i>
RH7017	<i>sec31-1 erv14-mCi</i>	<i>Mat α sec31-1 erv14-mCi-SpHIS5 leu2 ura3 lys2 trp1 his3</i>
RH7021	<i>WT</i>	<i>Mat a leu2 ura3 met15 his3</i>
RH7022	<i>emp24Δ</i>	<i>Mat a emp24Δ::KanMX leu2 ura3 met15 his3</i>
RH7023	<i>erv25Δ</i>	<i>Mat a erv25Δ::KanMX leu2 ura3 met15 his3</i>
RH7025	<i>bst1Δ</i>	<i>Mat a bst1Δ::KanMX leu2 ura3 met15 his3</i>
RH7026	<i>per1Δ</i>	<i>Mat a per1Δ::KanMX leu2 ura3 met15 his3</i>
RH7030	<i>erv14Δ</i>	<i>Mat a erv14Δ::KanMX leu2 ura3 met15 his3</i>
RH7085	<i>bst1Δ emp24Δ</i>	<i>Mat a bst1Δ::KanMX emp24Δ::KanMX ura3 leu2 lys2 trp1 his3</i>
RH7096	<i>bst1Δ</i>	<i>Mat a bst1Δ::KanMX ura3 leu2 lys2 trp1 his3</i>
RH7097	<i>sec31-1 bst1Δ</i>	<i>Mat a sec31-1 bst1Δ::KanMX ura3 leu2</i>
MMY596	<i>per1Δ</i>	<i>Mat a per1Δ::KanMX ura3 leu2 his4 trp1 ade2</i>
RH7121	<i>sec16-2 erv14-mCi</i>	<i>Mat a sec16-2 erv14-mCi-SpHIS5 leu2 ura3 his3 lys2 trp1</i>
RH7155	<i>sec12-4 erv14-mCi</i>	<i>Mat α sec12-4 erv14-mCi-SpHIS5 ura3 leu2his3</i>
RH7129	<i>sec31-1 bst1Δ erv14-mCi</i>	<i>Mat α sec31-1 bst1Δ::KanMX erv14-mCi-SpHIS5 leu2 ura3 his3</i>
RH7147	<i>per1Δ emp24Δ</i>	<i>Mat a per1Δ::KanMX emp24Δ::LEU2 ura3 leu2 his4 trp1</i>
MMY756	<i>emp24 3xHA</i>	<i>Mat a emp24 3xHA::KanMX ura3 leu2 his3</i>
MMY631	<i>emp24 3xHA</i>	<i>Mat α emp24 3xHA::KanMX ura3 leu2 his3 lys2</i>
BY4742	<i>gas1Δ</i>	<i>Mat α gas1Δ::KanMX ura3 leu2 his3 lys2</i>
MMY664	<i>emp24 3xHA gas1Δ</i>	<i>Mat a emp24-3xHA::KanMX gas1Δ::KanMX ura3 leu2 his3 lys2</i>

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que el complejo p24 ejerce dos importantes funciones en las etapas iniciales de la ruta secretora: una función general promoviendo la formación de las vesículas retrogradadas COPI derivadas de la membrana del Golgi y otra específica regulando el transporte intracelular de las proteínas ancladas a GPI mediante la supervisión del estado de madurez del glicolípido.

- **Papel del complejo p24 en la formación de las vesículas COPI que median el transporte retrógrado Golgi-RE.**

En este trabajo hemos llevado a cabo un análisis genético con objeto de abordar el estudio de las funciones desarrolladas por el complejo p24 al comienzo de la ruta secretora. Las interacciones genéticas y físicas observadas entre los miembros de la familia p24 y los componentes de la cubierta COPI, apoyan una función general de estas proteínas en la biogénesis de las vesículas COPI. Además, nuestros resultados evidencian de forma directa que la formación de vesículas COPI a partir de las membranas de Golgi depende del complejo p24. Por lo tanto, los hallazgos obtenidos avalan favorablemente estudios previos en los que se había relacionado a las proteínas p24 con el proceso de generación de vesículas COPI (69, 70, 98). También mostramos que la activación de la UPR mitiga el defecto en el transporte retrógrado provocado por la carencia de función del complejo p24. Debido a que la UPR regula múltiples funciones de la vía exocítica, incluido el transporte vesicular (25), la ausencia de las proteínas p24 podría ser compensada por la expresión de múltiples genes involucrados en las etapas iniciales de la ruta secretora.

La incorporación de las proteínas p24 en las vesículas COPI está mediada por interacciones específicas entre ellas y los componentes de la cubierta. Acorde con esta idea, hemos encontrado que la ArfGAP Glo3 es reclutada, específicamente, por los tallos citosólicos de las proteínas p24 mientras que la ArfGAP Gcs1p no. Este hallazgo es significativo ya que Glo3p, y no Gcs1p, ha sido previamente identificada como un componente específico de la cubierta COPI (99). Curiosamente, Glo3p alberga dos secuencias altamente conservada denominadas GRM (*Glo3-regulatory motif*) y BoCCS (*The binding of coatomer, cargo and SNARE*) que no se encuentran en Gcs1p y que son necesarias para el desarrollo de la función de Glo3p en la célula (100). Es posible que las interacciones específicas de Glo3p con el complejo p24 y el coatómero se realicen a través de estos motivos.

Por otro lado, los tallos citosólicos de las proteínas p24 también son capaces de reclutar al coatómero a través de un par de residuos aromáticos y un motivo di-lisina presentes en varios de los miembros de la familia (68). En células de mamífero, el coatómero interacciona con las proteínas p24 a través de su subunidad γ -COP, cuyo homólogo en levaduras es Sec21p (101). De este modo, la interacción de los tallos citosólicos de las proteínas p24 con Sec21p podría ser importante para el transporte vesicular. De hecho, la sobreexpresión de *EMP24* rescata el fenotipo del alelo mutante *sec21-3* (102) y los mutantes nulos de las proteínas p24 potencian la termosensibilidad de *sec21-1* y *sec27-1*. En total consonancia con estos datos, Glo3p interacciona de modo directo con estas mismas subunidades del coatómero, Sec21p and Sec27p (103). Además, nuestras observaciones indican que el requerimiento de las proteínas p24 en la formación de las vesículas COPI es prescindible en condiciones saturantes de coatómero, lo que apoya la idea de que el reclutamiento de la cubierta COPI es una función esencial del complejo p24. Consistente con esta hipótesis, la sobreexpresión de Glo3p pero no la de Gcs1p consigue restaurar el crecimiento del doble mutante *emp24 Δ sec21-1*. Por lo tanto, la estabilización de los complejos cebadores mediante las distintas interacciones entre las proteínas p24, Glo3p, coatómero y Arf1p podría facilitar la evaginación de vesículas en la membrana del Golgi.

Hay varias características específicas de las proteínas p24 que podrían explicar mecánicamente su importancia en la génesis de las vesículas COPI. Primero, varios estudios han sugerido que las proteínas p24 podrían reclutar inicialmente la forma inactiva de Arf1p a la membrana del Golgi, lo que sugiere que sus tallos citosólicos actuarían como receptores de Arf1-GDP (71, 104). Este reclutamiento inicial facilitaría la formación del complejo cebador y consecuentemente, la evaginación de la vesícula.

Segundo, la habilidad de las proteínas p24 para oligomerizar podría ser importante para promover el ensamblaje de la cubierta COPI. De hecho, un tetrámero compuesto por los tallos de la proteína p23 de mamíferos se une significativamente más fuerte al coatómero que a los dímeros correspondientes (101). De esta manera el complejo p24 podría facilitar la estabilización de los complejos cebadores al unir más firmemente el coatómero a la membrana.

Tercero, varios estudios recientes han observado que los tallos citosólicos de las proteínas p24 de mamíferos son capaces de potenciar la actividad GAP de ArfGAP2 (105) (homólogo de Glo3p) lo que haría que Arf1 quede libre para reclutar más cubierta y así crear nuevos complejos cebadores. Por tanto, las proteínas p24 no sólo estabilizarían los complejos cebadores al mantener los componentes de la cubierta asociados a la membrana del Golgi sino que también promoverían la formación de los mismos. En principio, este modelo sólo se

aplicaría para aquellas vesículas COPI enriquecidas en complejos p24 o en otras proteínas transmembranas con propiedades regulatorias similares sobre ArfGAP2/Glo3p. En este sentido, varios estudios han identificado una subpoblación de vesículas COPI enriquecidas en proteínas p24 (106, 107). El hecho de que estas vesículas carezcan de enzimas de Golgi sugiere que se trata de vesículas generadas a partir del compartimento *cis*-Golgi que median el transporte retrógrado Golgi-RE. De esta manera, es posible que existan mecanismos alternativos que generen diferentes subtipos de vesículas COPI. Por ejemplo, Glo3p, que ha sido relacionada con el transporte retrogrado Golgi-RE, podría ser regulada por las proteínas p24 en contraste con Gcs1p, que parece actuar, esencialmente, en el TGN (108).

En conjunto, los datos aportados por este y por otros estudios nos permiten proponer el siguiente modelo de formación de una vesícula COPI: 1) El complejo p24 atraería a Arf1-GDP a la membrana de Golgi para que su GEF Gea1p la active. 2) Arf1-GTP se ancla a la membrana y recluta a su vez al coatómero, el cual forma un complejo cebador con el complejo p24 y la ArfGAP Glo3p. 3) Seguidamente, la actividad GAP de Glo3p es estimulada por la asociación conjunta del complejo p24 y el coatómero, lo que promueve el paso de Arf1-GTP a Arf1-GDP. 4) Arf1-GDP se disocia para iniciar un nuevo ciclo de reclutamiento de cubierta COPI. 5) El complejo cebador sin Arf1p se mantiene estable en la membrana mediante la firme interacción de la cubierta COPI con las proteínas p24. 5) La estabilización del complejo cebador favorece tanto la incorporación de otras proteínas carga con menor capacidad para interactuar con el coatómero como el ensamblaje de la cubierta, que conlleva la generación de la vesícula COPI.

Finalmente, este trabajo apoya la noción de que algunas proteínas carga transmembrana en lugar de ser simples pasajeros, son esenciales en la regulación de la formación de las vesículas de transporte. Así, nuestros resultados coinciden con varios estudios que sugieren que las SNAREs, un tipo de proteínas carga transmembrana, a través de su interacción con las proteínas de cubierta, podrían jugar también un papel activo promoviendo la nucleación y el ensamblaje de las cubiertas (70, 102, 109-114). Por ejemplo, se ha observado que la formación de las vesículas AP-1 del TGN es directamente dependiente de la concentración de la carga (110). De este modo, queda por comprobar si además de las proteínas p24, otras moléculas que ciclan entre el RE y el Golgi, podrían realizar una función similar. En este caso, es posible que distintos tipos de proteínas transmembrana cooperen colectivamente en la formación eficiente de la vesícula COPI.

En suma, con este estudio hemos demostrado que el complejo p24 es necesario para la formación de la vesícula COPI en *Saccharomyces cerevisiae*, confirmando, en condiciones más

fisiológicas los estudios *in vitro* realizados en liposomas sintéticos con los tallos citosólicos de las proteínas p24 de mamíferos. También, nuestros datos avalan la hipótesis de que el complejo p24 actúa formando y estabilizando complejos cebadores sobre la membrana del Golgi. No obstante, además de determinar el mecanismo exacto de actuación de las proteínas p24, aún queda por examinar si esta función es específica del complejo p24 o si es una función corporativa realizada por las proteínas transmembranas que ciclan en la interfase RE-Golgi.

- **Papel específico del complejo p24 en la exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI mediante la monitorización del proceso de *remodeling*.**

En este trabajo hemos investigado el mecanismo por el cual el complejo p24 promueve, selectivamente, la exportación del RE de las proteínas ancladas a GPI. Nuestros estudios previos, usando un ensayo *in vitro* de producción de vesículas, demostraron que el complejo p24 participa directamente en la salida del RE de la proteína anclada a GPI, Gas1p, en vesículas COPII. También establecieron que las proteínas p24 interactúan físicamente con Gas1p en el interior de estas vesículas (87). En base a estos resultados y al hecho de que los tallos citosólicos de las proteínas p24 unen a la cubierta COPII con gran afinidad (68), se propuso que el complejo p24 podría actuar como un receptor de transporte específico para Gas1p, capturándolo selectivamente y concentrándolo en los ERES y vesículas COPII. Posteriormente, se comprobó que, además de Gas1p, otras proteínas ancladas a GPI también requieren del complejo p24 para salir apropiadamente del RE (43), por lo que el posible papel de receptor podría hacerse extensivo para toda la familia de proteínas ancladas a GPI. Sin embargo, en este estudio hemos mostrado que, aunque las proteínas p24 se unen específicamente en el RE a las proteínas ancladas a GPI a través de su glicolípido, el complejo p24 no interviene en su concentración en los ERES. Ello implica que el complejo p24 no se comporta como un receptor de transporte convencional y lo que es más importante, también sugiere que actúa posteriormente a la propia concentración en ERES de las proteínas ancladas a GPI. Esto concuerda con el hecho de que la concentración de las proteínas ancladas a GPI no depende del ensamblaje de la cubierta COPII pero sí del *remodeling* del motivo GPI (43). Es más, el hecho de que Emp24p interactúe preferencialmente con las proteínas ancladas a GPI ya remodeladas, apoya bastante la idea de que el complejo p24 promueve la exportación del RE después del proceso de *remodeling* y, por lo tanto, de la concentración en ERES.

Una posibilidad para explicar el papel del complejo p24 en la salida del RE de las proteínas ancladas a GPI, es que éste facilite específicamente la formación de vesículas COPII

en los ERES donde se concentran. Dada su gran capacidad para interactuar con los componentes COPII, los complejos p24 podrían crear sitios de unión para la cubierta en tales ERES. De esta manera, se estabilizarían los complejos cebadores, favoreciendo la polimerización de la cubierta y en consecuencia, la biogénesis de vesículas COPII. Este proceso sería análogo al que hemos propuesto para el sistema COPI en el Golgi.

El mecanismo descrito podría haber surgido en respuesta a la ausencia de tallos citosólicos, capaces de reclutar cubierta COPII, en ERES enriquecidos en proteínas ancladas a GPI, ya que éstas son completamente luminales. Por lo tanto, según este modelo, el complejo p24 actuaría como un adaptador que conecta las proteínas ancladas a GPI remodeladas con la cubierta COPII. Curiosamente, se ha visto que el mutante nulo de *LST1* afecta específicamente al transporte de las proteínas ancladas a GPI (115). *Lst1p* es una de las isoformas de *Sec24p*, la subunidad del coatómero encargada de reconocer a las proteínas carga transmembrana e incorporarlas en las vesículas (116). Por tanto, *Lst1p* podría ser usada selectivamente para generar las vesículas COPII que transportan a las proteínas ancladas a GPI hasta el Golgi. Estudios adicionales sobre esta proteína han mostrado que esta subunidad posee un bolsillo de interacción que es específico para las proteínas p24, ya que mutaciones puntuales que lo destruyen, impiden selectivamente la incorporación de las proteínas p24 en la vesícula (117). Por consiguiente, estos indicios sugieren la interesante posibilidad de que el complejo p24 conecte a las proteínas ancladas a GPI con la cubierta COPII a través de la subunidad *Lst1p*. Reforzando así la función del complejo p24 como adaptador específico de cubierta para las proteínas ancladas a GPI.

Además de promover la exportación del RE de las proteínas ancladas a GPI, este estudio revela que el complejo p24 también participa en su control de calidad monitorizando el proceso de *remodeling* del GPI. De hecho, *Emp24p* es capaz de interactuar establemente con las proteínas ancladas a GPI no remodeladas. Además, en los mutantes de *remodeling*, tanto *Emp24p* como las proteínas ancladas a GPI se acumulan específicamente en el RE. Por último, la ausencia del complejo p24 en estos mutantes de *remodeling* hace que las proteínas ancladas a GPI no remodeladas sean transportadas más eficientemente, y que la UPR se potencie sinérgicamente. Por tanto, en base a estos resultados, proponemos que el complejo p24 de levaduras juega un nuevo papel específico en el control de calidad de las proteínas ancladas a GPI, reteniéndolas en el RE hasta que sean correctamente remodeladas.

Estudios previos han insinuado que las proteínas p24 podrían realizar una función completamente pasiva en el control de calidad general de las proteínas de secreción,

restringiendo indirectamente la entrada de las proteínas mal plegadas y proteínas residentes del RE en las vesículas COPII. De hecho, la eliminación de una de las proteínas p24 de *Caenorhabditis. elegans*, SEL-9, permite que algunas proteínas mal plegadas escapen al control de calidad en la ruta secretora (94). Aunque, en realidad, este fenotipo puede corresponderse perfectamente con un defecto en el transporte retrógrado mediado por el complejo p24. De todas formas, y al contrario que esta discutible función pasiva, nosotros proponemos en este estudio la existencia de un mecanismo activo, completamente diferente por el que las proteínas ancladas a GPI no remodeladas son selectivamente retenidas en el RE por el complejo p24. El complejo p24 podría unirse a las proteínas ancladas a GPI no remodeladas en el RE, viajar conjuntamente hasta el Golgi y desde allí devolverlas al RE usando el transporte retrógrado COPI. Consistente con este mecanismo de reciclaje, hemos observado que Emp24p se relocaliza completamente al RE cuando el proceso de *remodeling* es defectuoso. De igual manera, el receptor KDEL de mamíferos localizado en el *cis*-Golgi, también redistribuye al RE cuando se sobreexpresan proteínas conteniendo la señal KDEL (118). Consistente con esta función de reciclaje, el complejo p24 viaja eficientemente en las vesículas retrógradas COPI. Además, juega un papel esencial en el transporte retrógrado Golgi-RE, facilitando la formación de las propias vesículas COPI, como se demostró en el trabajo anterior. Por consiguiente, el complejo p24 podría actuar en este caso como un receptor de transporte retrógrado específico, que evitaría el avance por la ruta secretora de las proteínas ancladas a GPI no remodeladas.

Los mecanismos moleculares responsables tanto de la exportación de las proteínas ancladas a GPI como de su retención en el RE parecen implicar el reconocimiento específico del motivo GPI por parte del complejo p24. De hecho, Emp24p es capaz de unir Gas1p pero no Gas1/TMD, a la que se le ha sustituido la señal de anclaje por un dominio transmembrana, o Gas1Q, a la que se le ha mutado el sitio ω para prevenir el anclaje. Además, la localización de Emp24p se ve fuertemente alterada por la presencia en el RE de las proteínas ancladas a GPI no remodeladas, pero no cuando la síntesis del motivo GPI es defectuosa como en el caso de las células *gpi1Δ*. Una posibilidad es que Emp24p reconozca específicamente el motivo lipídico del GPI. Apoyando esta idea se ha observado que algunas proteínas p24 de mamíferos son capaces de interactuar con lípidos específicos (comunicación personal del Dr. Felix Wieland). Alternativa o adicionalmente, Emp24p también podría reconocer el esqueleto de glicanos del GPI.

En suma, con respecto al tráfico específico de las proteínas ancladas a GPI a lo largo de la ruta secretora, el complejo p24 de levadura parece actuar como una proteína acompañante con una doble función: 1) El complejo p24 promovería la salida eficiente del RE de las

proteínas ancladas a GPI remodeladas facilitando la formación de vesículas COPII en los ERES donde éstas se concentran. 2) El complejo p24 evitaría el avance de las proteínas ancladas a GPI no remodeladas por la ruta secretora mediante su devolución al RE desde el Golgi. Este papel dual podría explicarse por las diferentes afinidades de unión que las proteínas p24 muestran respecto a las proteínas ancladas a GPI según el estado de madurez del glicolípido. De hecho, la unión preferencial de las proteínas p24 hacia las proteínas ancladas a GPI remodeladas, aseguraría que solo interaccionen con aquellas proteínas ancladas a GPI que realmente estén listas para ser exportadas del RE. Ello evitaría una unión prematura que podría competir con la maquinaria de *remodeling* y por lo tanto interferir con la maduración del GPI. No obstante, si las proteínas ancladas a GPI no son correctamente procesadas por la maquinaria de *remodeling*, el complejo p24 todavía podría interaccionar con ellas mediante una unión más débil pero lo suficientemente efectiva como para retenerlas en el RE.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos el siguiente modelo: las proteínas ancladas a GPI son sometidas a un proceso de *remodeling* que conduce a su segregación y concentración en ERES específicos. Posteriormente, los complejos p24 son atraídos eficientemente a esos ERES gracias a su elevada afinidad por las proteínas ancladas a GPI remodeladas. Una vez allí, el complejo p24 actúa reclutando y estabilizando la cubierta COPII. En consecuencia, se generan de manera eficiente vesículas que contienen específicamente proteínas ancladas a GPI correctamente remodeladas. Durante o después de su llegada al Golgi, las proteínas ancladas a GPI se disocian del complejo p24, permitiendo su progreso a través de la ruta secretora hasta alcanzar, finalmente, la membrana plasmática. Por el contrario, si el proceso de *remodeling* falla, las proteínas ancladas a GPI no pueden concentrarse en los ERES. No obstante, podrían salir eventualmente del RE de forma pasiva o por *bulk flow* hasta alcanzar el Golgi. Ya sea en el RE o en el Golgi el complejo p24 es capaz de reconocer estas proteínas y promover el transporte retrógrado COPI que evite su avance en la ruta secretora.

Este modelo plantea una importante cuestión referente al mecanismo de disociación de las proteínas ancladas a GPI del complejo p24. Dado que las proteínas p24 residen en la interfase RE-Golgi, y que las proteínas ancladas a GPI son enviadas a la membrana plasmática, ambos tipos de proteínas deben, lógicamente, separarse en algún punto del comienzo de la ruta secretora. El hecho de que Emp24p no interaccione con la forma madura de Golgi de Gas1p indica que la disociación ocurre probablemente justo con su llegada a este orgánulo. Un posible mecanismo de liberación podría basarse en las propiedades especiales de las proteínas ancladas a GPI remodeladas. En este sentido, el proceso de *remodeling* conlleva la asociación de las

proteínas ancladas a GPI a los *rafts* (119). Curiosamente, se ha observado en células de mamífero que, de manera concomitante a su asociación a *rafts*, las proteínas ancladas a GPI oligomerizan en el Golgi (120). Por lo tanto, una posibilidad es que el proceso de *remodeling* dispare la oligomerización de las proteínas ancladas a GPI impidiendo su propia entrada en las vesículas COPI, y contribuyendo a su vez a la liberación de las proteínas p24, las cuales retornarían al RE. Por el contrario, las proteínas ancladas a GPI no remodeladas que han escapado hasta el Golgi podrían ser devueltas al RE debido a su continua asociación con el complejo p24, ya que al no oligomerizar no podrían disociarse de las proteínas p24.

Este estudio apoya la idea de la existencia de una íntima conexión entre la maquinaria de exportación del RE y el control de calidad al comienzo de la ruta secretora. En este sentido, nuestros hallazgos están en consonancia con varios estudios en los que se sugiere que los factores de exportación contribuyen activamente al control de calidad de su propia carga específica. Por ejemplo, la degradación en el RE de la proteína mal plegada CPY* o la forma monomérica no ensamblada de ALP, parecen depender directamente de sus respectivos receptores de transporte, Erv29p y Erv26p (121, 122). Sin embargo, en vez de monitorizar el plegamiento o ensamblaje de las proteínas, el nuevo mecanismo encontrado en este estudio supervisa el motivo lipídico del GPI. Por otro lado, la función de control de calidad del complejo p24 podría estar conservada entre levaduras y mamíferos, ya que en una línea celular defectuosa en la enzima que deacila al inositol del GPI, PGAP1 (el ortólogo de Bst1p en levadura), las proteínas ancladas a GPI también se acumulan en el RE (123).

CONCLUSIONES

FUNCIÓN RETRÓGRADA

- 1. El complejo p24 de *Saccharomyces cerevisiae* promueve la formación de las vesículas retrógradas COPI derivadas del Golgi estabilizando los elementos de la cubierta en la membrana.**
- 2. La respuesta a proteínas mal plegadas compensa la pérdida de función del complejo p24 en el transporte retrógrado.**

FUNCIÓN ANTERÓGRADA

- 3. El complejo p24 reconoce específicamente a las proteínas ancladas a GPI a través del motivo GPI.**
- 4. El complejo p24 regula la salida específica del RE de las proteínas ancladas a GPI mediante una función de control de calidad que monitoriza el remodeling del motivo GPI.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion, *Cell* 116, 153-166.
2. Aridor, M., and Hannan, L. A. (2000) Traffic jam: a compendium of human diseases that affect intracellular transport processes, *Traffic* 1, 836-851.
3. Strating, J. R., and Martens, G. J. (2009) The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface, *Biol Cell* 101, 495-509.
4. Lee, M. C., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R. (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi, *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 87-123.
5. Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191.
6. Emr, S., Glick, B. S., Linstedt, A. D., Lippincott-Schwartz, J., Luini, A., Malhotra, V., Marsh, B. J., Nakano, A., Pfeffer, S. R., Rabouille, C., Rothman, J. E., Warren, G., and Wieland, F. T. (2009) Journeys through the Golgi--taking stock in a new era, *J Cell Biol* 187, 449-453.
7. Glick, B. S., and Nakano, A. (2009) Membrane traffic within the Golgi apparatus, *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 113-132.
8. Fromme, J. C., Orci, L., and Schekman, R. (2008) Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23, *Trends Cell Biol* 18, 330-336.
9. Stagg, S. M., LaPointe, P., Razvi, A., Gurkan, C., Potter, C. S., Carragher, B., and Balch, W. E. (2008) Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly, *Cell* 134, 474-484.
10. Springer, S., Spang, A., and Schekman, R. (1999) A primer on vesicle budding, *Cell* 97, 145-148.
11. Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle, *Dev Cell* 12, 671-682.
12. Pucadyil, T. J., and Schmid, S. L. (2009) Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation, *Science* 325, 1217-1220.
13. Hehnlly, H., and Stamnes, M. (2007) Regulating cytoskeleton-based vesicle motility, *FEBS Lett* 581, 2112-2118.
14. Stamnes, M. (2002) Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport, *Curr Opin Cell Biol* 14, 428-433.
15. Sztul, E., and Lupashin, V. (2009) Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic, *FEBS Lett* 583, 3770-3783.
16. Sudhof, T. C., and Rothman, J. E. (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins, *Science* 323, 474-477.

17. Hsu, V. W., Lee, S. Y., and Yang, J. S. (2009) The evolving understanding of COPI vesicle formation, *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 360-364.
18. Langer, J. D., Stoops, E. H., Bethune, J., and Wieland, F. T. (2007) Conformational changes of coat proteins during vesicle formation, *FEBS Lett* 581, 2083-2088.
19. Bethune, J., Wieland, F., and Moelleken, J. (2006) COPI-mediated transport, *J Membr Biol* 211, 65-79.
20. Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast, *Nature* 425, 737-741.
21. Dancourt, J., and Barlowe, C. (2010) Protein sorting receptors in the early secretory pathway, *Annu Rev Biochem* 79, 777-802.
22. Anelli, T., and Sitia, R. (2008) Protein quality control in the early secretory pathway, *EMBO J* 27, 315-327.
23. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005) ERAD: the long road to destruction, *Nat Cell Biol* 7, 766-772.
24. Vembar, S. S., and Brodsky, J. L. (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 944-957.
25. Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S., and Walter, P. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation, *Cell* 101, 249-258.
26. Ma, Y., and Hendershot, L. M. (2004) ER chaperone functions during normal and stress conditions, *J Chem Neuroanat* 28, 51-65.
27. Hetz, C., and Glimcher, L. H. (2009) Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome, *Mol Cell* 35, 551-561.
28. Spang, A. (2009) On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle, *Curr Opin Cell Biol* 21, 531-536.
29. Thor, F., Gautschi, M., Geiger, R., and Helenius, A. (2009) Bulk flow revisited: transport of a soluble protein in the secretory pathway, *Traffic* 10, 1819-1830.
30. Kuehn, M. J., Herrmann, J. M., and Schekman, R. (1998) COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles, *Nature* 391, 187-190.
31. Otte, S., and Barlowe, C. (2002) The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER, *EMBO J* 21, 6095-6104.
32. Ma, D., Zerangue, N., Raab-Graham, K., Fried, S. R., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2002) Diverse trafficking patterns due to multiple traffic motifs in G protein-activated inwardly rectifying potassium channels from brain and heart, *Neuron* 33, 715-729.

33. Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S., Zhou, H., Woodley, D., Polischuk, R., Schekman, R., and Malhotra, V. (2009) TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites, *Cell* 136, 891-902.
34. Baker, E. K., Colley, N. J., and Zuker, C. S. (1994) The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin, *EMBO J* 13, 4886-4895.
35. Colley, N. J., Baker, E. K., Stamnes, M. A., and Zuker, C. S. (1991) The cyclophilin homolog ninaA is required in the secretory pathway, *Cell* 67, 255-263.
36. Miller, E. A., and Barlowe, C. (2010) Regulation of coat assembly--sorting things out at the ER, *Curr Opin Cell Biol* 22, 447-453.
37. Sato, K., and Nakano, A. (2007) Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting, *FEBS Lett* 581, 2076-2082.
38. Sato, K. (2004) COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum, *J Biochem* 136, 755-760.
39. Hammond, A. T., and Glick, B. S. (2000) Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells, *Mol Biol Cell* 11, 3013-3030.
40. Shindiapina, P., and Barlowe, C. (2010) Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Biol Cell* 21, 1530-1545.
41. Connerly, P. L., Esaki, M., Montegna, E. A., Strongin, D. E., Levi, S., Soderholm, J., and Glick, B. S. (2005) Sec16 is a determinant of transitional ER organization, *Curr Biol* 15, 1439-1447.
42. Budnik, A., and Stephens, D. J. (2009) ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation, *FEBS Lett* 583, 3796-3803.
43. Castillon, G. A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T. M., and Riezman, H. (2009) Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast, *Traffic* 10, 186-200.
44. Muniz, M., Morsomme, P., and Riezman, H. (2001) Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum, *Cell* 104, 313-320.
45. Jackson, M. R., Nilsson, T., and Peterson, P. A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum, *EMBO J* 9, 3153-3162.
46. Schutze, M. P., Peterson, P. A., and Jackson, M. R. (1994) An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum, *EMBO J* 13, 1696-1705.
47. Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M. A., and Rothman, J. E. (1996) Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors, *Science* 273, 1396-1399.
48. Mallabiabarrena, A., Fresno, M., and Alarcon, B. (1992) An endoplasmic reticulum retention signal in the CD3 epsilon chain of the T-cell receptor, *Nature* 357, 593-596.

49. O'Kelly, I., Butler, M. H., Zilberberg, N., and Goldstein, S. A. (2002) Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals, *Cell* 111, 577-588.
50. Reiterer, V., Nyfeler, B., and Hauri, H. P. (2010) Role of the lectin VIP36 in post-ER quality control of human alpha1-antitrypsin, *Traffic* 11, 1044-1055.
51. Rein, U., Andag, U., Duden, R., Schmitt, H. D., and Spang, A. (2002) ARF-GAP-mediated interaction between the ER-Golgi v-SNAREs and the COPI coat, *J Cell Biol* 157, 395-404.
52. Peyroche, A., Paris, S., and Jackson, C. L. (1996) Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein, *Nature* 384, 479-481.
53. Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S., and Nakayama, K. (2002) GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat, *Traffic* 3, 483-495.
54. Donaldson, J. G., and Jackson, C. L. (2000) Regulators and effectors of the ARF GTPases, *Curr Opin Cell Biol* 12, 475-482.
55. Monetta, P., Slavin, I., Romero, N., and Alvarez, C. (2007) Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association, *Mol Biol Cell* 18, 2400-2410.
56. Chantalat, S., Courbeyrette, R., Senic-Matuglia, F., Jackson, C. L., Goud, B., and Peyroche, A. (2003) A novel Golgi membrane protein is a partner of the ARF exchange factors Gea1p and Gea2p, *Mol Biol Cell* 14, 2357-2371.
57. Hsu, V. W., and Yang, J. S. (2009) Mechanisms of COPI vesicle formation, *FEBS Lett* 583, 3758-3763.
58. Spang, A., Shiba, Y., and Randazzo, P. A. (2010) Arf GAPs: gatekeepers of vesicle generation, *FEBS Lett* 584, 2646-2651.
59. Ambroggio, E., Sorre, B., Bassereau, P., Goud, B., Manneville, J. B., and Antonny, B. (2010) ArfGAP1 generates an Arf1 gradient on continuous lipid membranes displaying flat and curved regions, *EMBO J* 29, 292-303.
60. Carney, G. E., and Bowen, N. J. (2004) p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities, *Biol Cell* 96, 271-278.
61. Marzioch, M., Henthorn, D. C., Herrmann, J. M., Wilson, R., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J., Solari, R. C., and Rowley, A. (1999) Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex, *Mol Biol Cell* 10, 1923-1938.
62. Boltz, K. A., Ellis, L. L., and Carney, G. E. (2007) *Drosophila melanogaster* p24 genes have developmental, tissue-specific, and sex-specific expression patterns and functions, *Dev Dyn* 236, 544-555.
63. Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J. P., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J., and Nilsson, T. (1998) gp25L/emp24/p24 protein family

- members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer, *J Cell Biol* 140, 751-765.
64. Anantharaman, V., and Aravind, L. (2002) The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion, *Genome Biol* 3, research0023.
 65. Fullekrug, J., Suganuma, T., Tang, B. L., Hong, W., Storrie, B., and Nilsson, T. (1999) Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members, *Mol Biol Cell* 10, 1939-1955.
 66. Belden, W. J., and Barlowe, C. (1996) Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport, *J Biol Chem* 271, 26939-26946.
 67. Denzel, A., Otto, F., Girod, A., Pepperkok, R., Watson, R., Rosewell, I., Bergeron, J. J., Solari, R. C., and Owen, M. J. (2000) The p24 family member p23 is required for early embryonic development, *Curr Biol* 10, 55-58.
 68. Belden, W. J., and Barlowe, C. (2001) Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex, *J Biol Chem* 276, 43040-43048.
 69. Stamnes, M. A., Craighead, M. W., Hoe, M. H., Lampen, N., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1995) An integral membrane component of coatomer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8011-8015.
 70. Bremser, M., Nickel, W., Schweikert, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Hughes, C. A., Sollner, T. H., Rothman, J. E., and Wieland, F. T. (1999) Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors, *Cell* 96, 495-506.
 71. Gommel, D. U., Memon, A. R., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner, J., Reinhard, C., Helms, J. B., Nickel, W., and Wieland, F. T. (2001) Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23, *EMBO J* 20, 6751-6760.
 72. Reinhard, C., Harter, C., Bremser, M., Brugger, B., Sohn, K., Helms, J. B., and Wieland, F. (1999) Receptor-induced polymerization of coatomer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1224-1228.
 73. Langer, J. D., Roth, C. M., Bethune, J., Stoops, E. H., Brugger, B., Herten, D. P., and Wieland, F. T. (2008) A conformational change in the alpha-subunit of coatomer induced by ligand binding to gamma-COP revealed by single-pair FRET, *Traffic* 9, 597-607.
 74. Springer, S., Chen, E., Duden, R., Marzioch, M., Rowley, A., Hamamoto, S., Merchant, S., and Schekman, R. (2000) The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4034-4039.
 75. Kapteyn, J. C., Van Den Ende, H., and Klis, F. M. (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall, *Biochim Biophys Acta* 1426, 373-383.

76. Leidich, S. D., Drapp, D. A., and Orlean, P. (1994) A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis, *J Biol Chem* 269, 10193-10196.
77. Kinoshita, T., Inoue, N., and Takeda, J. (1995) Defective glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Adv Immunol* 60, 57-103.
78. Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirinda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., and et al. (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication, *Cell* 63, 673-686.
79. Cowman, A. F., and Crabb, B. S. (2006) Invasion of red blood cells by malaria parasites, *Cell* 124, 755-766.
80. Gatti, E., Popolo, L., Vai, M., Rota, N., and Alberghina, L. (1994) O-linked oligosaccharides in yeast glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein gp115 are clustered in a serine-rich region not essential for its function, *J Biol Chem* 269, 19695-19700.
81. Caro, L. H., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F., van den Ende, H., and Klis, F. M. (1997) In silico identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 13, 1477-1489.
82. Gentsch, M., and Tanner, W. (1997) Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases, *Glycobiology* 7, 481-486.
83. Mayor, S., and Riezman, H. (2004) Sorting GPI-anchored proteins, *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 110-120.
84. Schroeder, R., London, E., and Brown, D. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12130-12134.
85. Fujita, M., and Jigami, Y. (2008) Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function, *Biochim Biophys Acta* 1780, 410-420.
86. Schimmoller, F., Singer-Kruger, B., Schroder, S., Kruger, U., Barlowe, C., and Riezman, H. (1995) The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi, *EMBO J* 14, 1329-1339.
87. Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H. P., and Riezman, H. (2000) The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles, *J Cell Biol* 148, 925-930.
88. Luo, W., Wang, Y., and Reiser, G. (2007) p24A, a type I transmembrane protein, controls ARF1-dependent resensitization of protease-activated receptor-2 by influence on receptor trafficking, *J Biol Chem* 282, 30246-30255.
89. Wang, H., and Kazanietz, M. G. (2002) Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain, *J Biol Chem* 277, 4541-4550.

90. Gayle, M. A., Slack, J. L., Bonnert, T. P., Renshaw, B. R., Sonoda, G., Taguchi, T., Testa, J. R., Dower, S. K., and Sims, J. E. (1996) Cloning of a putative ligand for the T1/ST2 receptor, *J Biol Chem* 271, 5784-5789.
91. Chen, F., Hasegawa, H., Schmitt-Ulms, G., Kawarai, T., Bohm, C., Katayama, T., Gu, Y., Sanjo, N., Glista, M., Rogueva, E., Wakutani, Y., Pardossi-Piquard, R., Ruan, X., Tandon, A., Checler, F., Marambaud, P., Hansen, K., Westaway, D., St George-Hyslop, P., and Fraser, P. (2006) TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity, *Nature* 440, 1208-1212.
92. Vetrivel, K. S., Gong, P., Bowen, J. W., Cheng, H., Chen, Y., Carter, M., Nguyen, P. D., Placanica, L., Wieland, F. T., Li, Y. M., Kounnas, M. Z., and Thinakaran, G. (2007) Dual roles of the transmembrane protein p23/TMP21 in the modulation of amyloid precursor protein metabolism, *Mol Neurodegener* 2, 4.
93. Dolcini, V., Dunys, J., Sevalle, J., Chen, F., Guillot-Sestier, M. V., St George-Hyslop, P., Fraser, P. E., and Checler, F. (2008) TMP21 regulates Abeta production but does not affect caspase-3, p53, and neprilysin, *Biochem Biophys Res Commun* 371, 69-74.
94. Wen, C., and Greenwald, I. (1999) p24 proteins and quality control of LIN-12 and GLP-1 trafficking in *Caenorhabditis elegans*, *J Cell Biol* 145, 1165-1175.
95. Barr, F. A., Preisinger, C., Kopajtich, R., and Korner, R. (2001) Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus, *J Cell Biol* 155, 885-891.
96. Mitrovic, S., Ben-Tekaya, H., Koezler, E., Gruenberg, J., and Hauri, H. P. (2008) The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi, *Mol Biol Cell* 19, 1976-1990.
97. Rojo, M., Pepperkok, R., Emery, G., Kellner, R., Stang, E., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (1997) Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport, *J Cell Biol* 139, 1119-1135.
98. Sohn, K., Orci, L., Ravazzola, M., Amherdt, M., Bremser, M., Lottspeich, F., Fiedler, K., Helms, J. B., and Wieland, F. T. (1996) A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatamer binding, *J Cell Biol* 135, 1239-1248.
99. Lewis, S. M., Poon, P. P., Singer, R. A., Johnston, G. C., and Spang, A. (2004) The ArfGAP Glo3 is required for the generation of COPI vesicles, *Mol Biol Cell* 15, 4064-4072.
100. Schindler, C., Rodriguez, F., Poon, P. P., Singer, R. A., Johnston, G. C., and Spang, A. (2009) The GAP domain and the SNARE, coatamer and cargo interaction region of the ArfGAP2/3 Glo3 are sufficient for Glo3 function, *Traffic* 10, 1362-1375.
101. Bethune, J., Kol, M., Hoffmann, J., Reckmann, I., Brugger, B., and Wieland, F. (2006) Coatamer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins, *Mol Cell Biol* 26, 8011-8021.

102. Sandmann, T., Herrmann, J. M., Dengjel, J., Schwarz, H., and Spang, A. (2003) Suppression of coatamer mutants by a new protein family with COPI and COPII binding motifs in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Biol Cell* 14, 3097-3113.
103. Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., and Duden, R. (2000) COP I domains required for coatamer integrity, and novel interactions with ARF and ARF-GAP, *EMBO J* 19, 3905-3917.
104. Majoul, I., Sohn, K., Wieland, F. T., Pepperkok, R., Pizza, M., Hillemann, J., and Soling, H. D. (1998) KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p, *J Cell Biol* 143, 601-612.
105. Luo, R., Ha, V. L., Hayashi, R., and Randazzo, P. A. (2009) Arf GAP2 is positively regulated by coatamer and cargo, *Cell Signal* 21, 1169-1179.
106. Lanoix, J., Ouwendijk, J., Stark, A., Szafer, E., Cassel, D., Dejgaard, K., Weiss, M., and Nilsson, T. (2001) Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1, *J Cell Biol* 155, 1199-1212.
107. Malsam, J., Satoh, A., Pelletier, L., and Warren, G. (2005) Golgin tethers define subpopulations of COPI vesicles, *Science* 307, 1095-1098.
108. Poon, P. P., Nothwehr, S. F., Singer, R. A., and Johnston, G. C. (2001) The Gcs1 and Age2 ArfGAP proteins provide overlapping essential function for transport from the yeast trans-Golgi network, *J Cell Biol* 155, 1239-1250.
109. Liu, W., Duden, R., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (2005) ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells, *J Cell Biol* 168, 1053-1063.
110. Le Borgne, R., and Hoflack, B. (1997) Mannose 6-phosphate receptors regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN, *J Cell Biol* 137, 335-345.
111. Hirschberg, K., Miller, C. M., Ellenberg, J., Presley, J. F., Siggia, E. D., Phair, R. D., and Lippincott-Schwartz, J. (1998) Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells, *J Cell Biol* 143, 1485-1503.
112. Haucke, V., and De Camilli, P. (1999) AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs, *Science* 285, 1268-1271.
113. Springer, S., and Schekman, R. (1998) Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs, *Science* 281, 698-700.
114. Forster, R., Weiss, M., Zimmermann, T., Reynaud, E. G., Verissimo, F., Stephens, D. J., and Pepperkok, R. (2006) Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites, *Curr Biol* 16, 173-179.
115. Peng, R., De Antoni, A., and Gallwitz, D. (2000) Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members, *J Biol Chem* 275, 11521-11528.

116. Roberg, K. J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., and Kaiser, C. A. (1999) LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol* 145, 659-672.
117. Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2003) Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles, *Cell* 114, 497-509.
118. Lewis, M. J., and Pelham, H. R. (1992) Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum, *Cell* 68, 353-364.
119. Maeda, Y., Tashima, Y., Houjou, T., Fujita, M., Yoko-o, T., Jigami, Y., Taguchi, R., and Kinoshita, T. (2007) Fatty acid remodeling of GPI-anchored proteins is required for their raft association, *Mol Biol Cell* 18, 1497-1506.
120. Paladino, S., Sarnataro, D., Tivodar, S., and Zurzolo, C. (2007) Oligomerization is a specific requirement for apical sorting of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins but not for non-raft-associated apical proteins, *Traffic* 8, 251-258.
121. Caldwell, S. R., Hill, K. J., and Cooper, A. A. (2001) Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi, *J Biol Chem* 276, 23296-23303.
122. Dancourt, J., and Barlowe, C. (2009) Erv26p-dependent export of alkaline phosphatase from the ER requires lumenal domain recognition, *Traffic* 10, 1006-1018.
123. Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y., and Kinoshita, T. (2004) Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p, *J Biol Chem* 279, 14256-14263.

