

# ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN Y LA REGULACIÓN DE ArfGAP1



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

**Dña. LAURA M<sup>a</sup> MARTÍNEZ SÁNCHEZ**

SEVILLA, 2015

La doctoranda

Laura M<sup>a</sup> Martínez Sánchez

El director y tutor

Ángel Velasco López

La codirectora

Josefina Hidalgo Jiménez







[...]

“No te rindas, por favor no cedas,

Aunque el frío queme,

Aunque el miedo muerda,

Aunque el sol se ponga y se calle el viento,

Aún hay fuego en tu alma,

Aún hay vida en tus sueños

Porque cada día es un comienzo nuevo,

Porque esta es la hora y el mejor momento”.

[...]

***No te rindas***, autor desconocido.



## AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas comienzo el final de una etapa. Una etapa de mi vida en la que he aprendido mucho, pero no sólo académicamente, sino personalmente también. Este hecho ha sido posible gracias a todas las personas que, durante mi camino, han estado a mi lado para enseñarme y apoyarme de una manera o de otra. Mirando hacia atrás, volvería sin dudas, a tomar la decisión de embarcarme en esta aventura llamada Tesis.

Quisiera agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, Ángel y Josefina, la oportunidad que me han dado para aprender a hacer ciencia. Vuestra larga experiencia investigadora ha sido un privilegio en el que me he podido apoyar durante todos estos años. Ángel, gracias por enseñarme a valorar lo que realmente tiene importancia y lo que no la tiene tanta y por impulsarme a tomar mis propias decisiones sin miedo a equivocarme. Josefina, gracias por inculcarme que cada detalle cuenta y por enseñarme, con esa pasión que te caracteriza, a llegar siempre al fondo de la cuestión.

Siempre estaré agradecida a mi Departamento, Biología Celular, no sólo por proporcionarme soporte para la realización de esta tesis, sino por hacerme sentir que formo parte de él. Nuestro Departamento no será muy grande pero lo que más me gusta es que en él intentamos cuidarnos los unos a los otros. Gracias a todos. En especial, José Manuel, gracias por los trámites y gestiones, Inma, gracias por tu ayuda como directora. Paula, a ti quiero agradecerte que me dieras la oportunidad de ser alumna interna del Departamento pues estaba deseando adentrarme en los cultivos celulares. Además te agradezco tu amistad y tu ayuda durante estos años, eres la alegría del Departamento. Luis, gracias por tu interés en nuestro trabajo y por las ganas de aportarnos siempre ideas nuevas. Manolo, gracias por seguir de cerca mi trayectoria y ayudarme en lo que ha estado en tu mano. Chari, gracias por hacer de nuestro Departamento un lugar mejor para trabajar. Reme, mi Reme, y la de todos los becarios, ¿qué hubiera sido de nosotros sin ti? Prefiero no imaginarlo. Gracias por ser para nosotros un ejemplo de profesionalidad y de gran persona, pero sobre todo gracias por cuidarnos como una madre y estar siempre ahí para todo.

Oficialmente no he tenido compañeros de laboratorio. He tenido alumnos internos, a los que intentaba enseñar lo mejor que podía; Rafa, me pillaste recién llegada, Fernando, a ti te pude enseñar algo de biología molecular, Pedro, aunque eras alumno interno y después de máster, realmente llegaste a ser para mí un verdadero compañero de laboratorio. Muchas gracias porque durante esos dos años aprendí a trabajar en equipo y me sentí muy acompañada. Realmente creo que me enseñaste tú más a mí que yo a ti. Ana Mari y Javi, mis levadurinos, vosotros habéis sido también mis compañeros de laboratorio aunque vuestras poyatas se encontraban en el pasillo paralelo. Ana Mari, amiga, gracias por compartir tanto conmigo y por tu ayuda en todos estos años, hemos crecido juntas científica y personalmente y estoy muy orgullosa de ello. Javi, muchísimas gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado desde el minuto cero en el que entré. Gracias amigo por estar siempre dispuesto a enseñarme y escucharme. A mis ingenieros Dani y Pedro, aunque sólo hemos compartido este último año, ha sido intenso, gracias por todo vuestro apoyo y por los ratos dentro y fuera del Departamento. Fabi, contigo compartí mis comienzos, gracias por enseñarme a hacer biología molecular y por estar pendiente de cómo iban las cosas. Laura, Marcos, Estefanía, José, gracias también por vuestro apoyo y por los momentos vividos entre pasillos y comedor.

No puedo olvidarme de mis compañeros y amigos de facultad, Vicky, Sara, Ángela, Irene, Lucía, Inés, Alvarito, Alejandro, Isa, Gonzalo y Miyuki. Gracias porque cada uno con su personalidad ha aportado mucho al grupo, sois geniales. Vicky, más que mi amiga eres mi hermana, gracias por alentarme siempre a seguir hacia delante. Sara y Ángela, mis amigas, mis compañeras de facultad, de residencia y de piso; chicas, sois mi familia, gracias por cuidarme siempre. Irene, gracias por ser tan especial, gracias por creer en mi trabajo y animarme. Inés, gracias por darme siempre energía positiva. Lucía, gracias por ver más allá de lo que la gente suele ver. Sois tres amigas como tres soles. Alvarito, aunque te llame en diminutivo eres para mí un amigo muy grande. Isa, gracias por tu ayuda. Paquito, gracias por animarme intentando que yo no me diera cuenta.

Lolo, nos conocimos cuando estaba terminando la tesis, hace más de un año y medio y ahora al fin termino. Estas cosas siempre se alargan pero gracias por



apoyarme tanto, animarme y confiar en mí en estos últimos momentos que suelen ser los más difíciles. Gracias por entender que no puedo salir temprano, que tengo ocupado el finde, que estoy liada... Te has convertido en un pilar importante en mi vida. Gracias por aportarme tantas cosas buenas. Contigo, mi vida es mucho más bonita.

Lo mejor se deja para el final y lo mejor del mundo para mí es mi familia. Sin ellos no sería nada. A mi familia Martínez le agradezco que siempre han promovido el interés por el conocimiento y con tantos ejemplos de éxitos en la familia es fácil tener referentes para crecer. El último has sido tú, Madrina, espero poder defender la tesis con la misma profesionalidad que tú. A mi familia Sánchez, mis primos, tío y sobre todo a mi tía Pepa os agradezco el interés que habéis tenido por mis estudios y “mis células” y vuestros deseos para que todo me vaya bien. Cuantísimo me hubiera gustado compartir este momento contigo, Abuelo. Gracias por preguntarme siempre cómo iba el laboratorio aunque no entendieras mucho de mi explicación. Espero que estés orgulloso de mí por ir cumpliendo mis metas.

Sofía, hermanita, gracias porque con tu personalidad has dado luz a mis sombras, gracias por creer en mí incondicionalmente, gracias también por ayudarme a mejorar el diseño de la tesis. Ahora que yo termino este camino tú lo comienzas, no me cabe duda de que conseguirás ser una doctora extraordinaria, cuenta con todo mi apoyo.

Papá y Mamá, Mamá y Papá; con vosotros no tengo palabras que puedan expresar mis sentimientos de gratitud. Gracias por ser como sois y gracias por haberme criado, educado y querido de tal forma que ahora sea una persona capaz de enfrentarse a cualquier reto en la vida. Vuestro ejemplo de profesionalidad, responsabilidad y pasión por vuestro trabajo es el que intentaré seguir toda mi vida. Gracias por vuestro apoyo incondicional, por impulsarme aún más arriba de mis metas y por no faltarme nunca. Gracias por dármelo todo para que este momento pueda llegar. Sois las mejores personas que he conocido en el mundo, con tanto amor que no os cabe en el corazón. Nunca hubiera podido imaginar unos padres y una hermana mejor. Os quiero muchísimo. INFINITAS GRACIAS familia.







# ÍNDICE GENERAL



<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
CONTEXTUALIZACIÓN.....	23
<i>TRANSPORTE VESICULAR.....</i>	<i>23</i>
MAQUINARIA MOLECULAR.....	23
TRÁFICO BIDIRECCIONAL RETÍCULO- GOLGI.....	25
FORMACIÓN DE LAS VESÍCULAS COPII.....	26
COMPARTIMENTO INTERMEDIO ENTRE EL RETÍCULO Y GOLGI (ERGIC).....	29
VESÍCULAS COPI: SIGNIFICACIÓN FUNCIONAL.....	30
VESÍCULAS COPI: COMPONENTES.....	30
VESÍCULAS COPI: FORMACIÓN.....	33
ArfGEFs.....	33
ArfGAPs.....	33
INTRODUCCIÓN.....	37
<i>ArfGAP1.....</i>	<i>37</i>
<i>ANTECEDENTES.....</i>	<i>45</i>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
ArfGAP1-YFP.....	54
<i>FACTORES RESPONSABLES DE LA ASOCIACIÓN DE ArfGAP1 A MEMBRANAS...58</i>	<i>58</i>
Relación con los Componentes de las Cubiertas COPI.....	58
Localización a nivel de ERGIC.....	61
Dominios de Interacción con Membranas.....	63
Efecto de la Vía del AMPc sobre el Reclutamiento de ArfGAP1.....	66
<i>FOSFORILACIÓN POR PKA.....69</i>	<i>69</i>
Caracterización Funcional de la Fosforilación de la Serina 360.....	72
<i>PRESENCIA DE ArfGAP1 EN EL NÚCLEO CELULAR.....79</i>	<i>79</i>
Diversidad Molecular de ArfGAP1.....	79
Caracterización de las formas moleculares.....	80
Presencia de ArfGAP1 en núcleo.....	82

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>83</b>
Localización .....	85
Papel en el transporte vesicular .....	86
Otras actividades funcionales.....	87
Regulación.....	88
Diversidad Molecular .....	88
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>95</b>
REACTIVOS.....	97
Construcciones génicas .....	97
Anticuerpos.....	100
Producción de proteínas recombinante marcadas con GST .....	101
Otros reactivos utilizados.....	102
MÉTODOS.....	102
1. <i>Procedimientos generales</i> .....	102
Cultivo celular y tratamientos .....	102
Baja Temperatura.....	103
Transfección .....	103
Silenciamiento de ArfGAP1.....	104
Subfraccionamiento celular.....	104
Inmunoprecipitación.....	105
Electroforesis y "western blot" .....	106
Inmunoblot .....	106
2. <i>Técnicas para el estudio de fosforilación</i> .....	107
Marcaje con Ortofosfato.....	107
Fosforilación <i>in vitro</i> de ArfGAP1.....	108
Desfosforilación con Fosfatasa Alcalina.....	108
3. <i>Técnicas para el análisis del transporte</i> .....	109
VSV-G.....	109
Toxina de Shiga .....	109
4. <i>Técnicas de microscopía óptica</i> .....	110
Inmunofluorescencia indirecta .....	110



Observación de células vivas al microscopio óptico .....	111
Fluorescencia total asociadas a membranas.....	111
FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).....	112
FLIP ( Fluorescence Loss In Photobleaching) .....	113
Adquisición de imágenes .....	113
<i>5. Técnicas de microscopía electrónica.....</i>	<i>113</i>
Microscopía electrónica.....	113
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>115</b>



# **ÍNDICE DE FIGURAS**



---

<b>Figura 1.</b> <i>Carácter bidireccional del transporte vesicular entre los diferentes orgánulos.....</i>	26
<b>Figura 2.</b> <i>Etapas en la formación de vesículas COPI.....</i>	35
<b>Figura 3.</b> <i>Detección de ArfGAP1 en células animales.....</i>	53
<b>Figura 4.</b> <i>Efecto de la expresión de ArfGAP1 sobre la localización intracelular de <math>\beta</math>-COP.....</i>	55
<b>Figura 5.</b> <i>Efecto de la expresión de ArfGAP1 sobre la organización del complejo de Golgi.....</i>	57
<b>Figura 6.</b> <i>Inhibición de la expresión de ArfGAP1 mediante siRNA.....</i>	59
<b>Figura 7.</b> <i>Efecto del silenciamiento de ArfGAP1 sobre la localización de <math>\beta</math>-COP.....</i>	60
<b>Figura 8.</b> <i>Efecto del tratamiento con Brefeldin A (BFA) sobre la localización de ArfGAP1.....</i>	61
<b>Figura 9.</b> <i>Efecto de la incubación a baja temperatura sobre la localización de ArfGAP1.....</i>	62
<b>Figura 10.</b> <i>Comparación de los modelos de distribución intracelular de diferentes isoformas de ArfGAP.....</i>	63
<b>Figura 11.</b> <i>Valoración de la capacidad de los dominios ALPS para mediar la asociación de ArfGAP1 a membranas intracelulares.....</i>	65
<b>Figura 12.</b> <i>Efecto de la estimulación celular con isoproterenol sobre el reclutamiento de proteínas de cubierta y sus reguladores.....</i>	67
<b>Figura 13.</b> <i>Efecto del tratamiento con agentes moduladores de la actividad PKA sobre la asociación de ArfGAP1 a membranas intracelulares.....</i>	68
<b>Figura 14.</b> <i>Análisis de la fosforilación in situ de ArfGAP1.....</i>	70

<b>Figura 15.</b> <i>Caracterización de serina 360 como lugar de fosforilación de ArfGAP1</i> .....	71
<b>Figura 16.</b> <i>Efecto de los moduladores de la actividad PKA sobre la fosforilación del residuo serina 360 de ArfGAP1</i> .....	72
<b>Figura 17.</b> <i>Fosforilación in vitro de ArfGAP1</i> .....	72
<b>Figura 18.</b> <i>Efecto de la mutación del residuo de serina 360 sobre la distribución intracelular de ArfGAP1</i> .....	73
<b>Figura 19.</b> <i>Efecto de la mutación S360A sobre la cinética de asociación a Golgi de ArfGAP1</i> .....	74
<b>Figura 20.</b> <i>Efecto de la mutación S360A sobre la cinética de disociación de ArfGAP1 desde el complejo de Golgi</i> .....	75
<b>Figura 21.</b> <i>Efecto de la mutación S360A sobre la organización ultraestructural del complejo de Golgi</i> .....	76
<b>Figura 22.</b> <i>Transporte intracelular de VSV-G en células carentes de ArfGAP1.</i>	77
<b>Figura 23.</b> <i>Transporte retrógrado Golgi-RE en células carentes de ArfGAP1...</i>	78
<b>Figura 24.</b> <i>Heterogeneidad molecular de ArfGAP1</i> .....	80
<b>Figura 25.</b> <i>Diferencias en el grado de fosforilación entre formas moleculares de ArfGAP1</i> .....	81
<b>Figura 26.</b> <i>Detección de ArfGAP1 en el núcleo celular</i> .....	82

# **ÍNDICE DE TABLAS**





<b>Tabla I.</b> Construcciones génicas.....	98
<b>Tabla II.</b> Oligonucleótidos.....	99
<b>Tabla III.</b> Anticuerpos primarios.....	100
<b>Tabla IV.</b> Anticuerpos secundarios.....	101
<b>Tabla V.</b> Concentración de las drogas aplicadas a los cultivos.....	103
<b>Tabla VI.</b> Tampones usados en los apartados Inmunoprecipitación, Electroforesis y “western blot” e Inmunoblot.....	107
<b>Tabla VII.</b> Tampones y productos utilizados en Inmunofluorescencia indirecta.....	111



## **ABREVIATURAS**



<b>ALPS</b> ( <i>ArfGAP1 Lipid Packig Sensor</i> )	Sensor de ArfGAP1 del empaquetamiento de lípidos
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>AP</b> ( <i>Alkaline Phosphatase</i> )	Fosfatasa alcalina
<b>Arf1</b> ( <i>ADP-Ribosylation factor 1</i> )	Factor de ADP ribosilación
<b>ATP</b> ( <i>Adenosine TriPhosphate</i> )	Adenosín trifosfato
<b>BARS</b> ( <i>Brefeldin A ADP-Ribosylated Substrate</i> )	Sustrato ADP-ribosilado de brefeldin A
<b>BFA</b> ( <i>BreFeldin A</i> )	Brefeldin A
<b>BSA</b> ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )	Albúmina de suero bovino
<b>CFP</b> ( <i>Cian Fluorescent Protein</i> )	Proteína fluorescente cian
<b>COPI</b> ( <i>Coated proteins I</i> )	Proteínas de cubierta tipo I
<b>COPII</b> ( <i>Coated proteins II</i> )	Proteínas de cubierta tipo II
<b>C<math>\alpha</math></b>	Isoforma $\alpha$ de la subunidad Catalítica de PKA
<b>DMEM</b> ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> )	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b> ( <i>EthyleneDiamineTetraAcetic acid</i> )	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ERES</b> ( <i>Endoplasmic Reticulum Exit Sites</i> )	Sitios de salida del retículo
<b>ERGIC</b> ( <i>Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediated Complex</i> )	Compartimento Intermedio

<b>FBS</b> <i>(Foetal Bovine Serum)</i>	Suero fetal bovino
<b>FLIP</b> <i>(Fluorescence Loss In Photobleaching)</i>	Pérdida de fluorescencia en un proceso de fotoblanqueado
<b>FRAP</b> <i>(Fluorescence Recovery After Photobleaching)</i>	Recuperación de fluorescencia tras el fotoblanqueado
<b>GalTfase</b> <i>(Galactosiltransferase)</i>	Galactosiltransferasa
<b>GAP</b> <i>(GTPase Activating Protein)</i>	Proteína de activación de la actividad GTPasa
<b>GAPDH</b> <i>(Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)</i>	Gliceraldehideo3-fosfato deshidrogenasa
<b>GDP</b> <i>(Guanosine DiPhosphate)</i>	Guanosín difosfato
<b>GEF</b> <i>(Guanine Exchange Factor)</i>	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
<b>GFP</b> <i>(Green Fluorescent Protein)</i>	Proteína fluorescente verde
<b>GST</b> <i>(Glutathione S-Transferase)</i>	Glutación-S-transferasa
<b>GTP</b> <i>(Guanosine TriPhosphate)</i>	Guanosín trifosfato
<b>H89</b>	N-(2-( <i>p</i> -bromocinamilamino)etil)-5-isoquinolinsulfonamida
<b>HRP</b> <i>(Horseradish peroxidase)</i>	Peroxidasa de rábano
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IPTG</b> <i>(Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside)</i>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>kDa</b>	Kilo Dalton

<b>LRRK2</b> <i>(Leucine-rich repeat kinase 2)</i>	Kinasa 2 rica en repeticiones de leucina
<b>MC</b>	Medio completo
<b>MEM</b> <i>(Minimum Esencial Medium)</i>	Medio mínimo esencial
<b>MM</b>	Medio mínimo
<b>PBS</b> <i>(Phosphate-Buffered Saline)</i>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b> <i>(Polymerase Chain Reaction)</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PIP2</b> <i>(Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate)</i>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
<b>PKA</b> <i>(Protein Kinase A)</i>	Proteína quinasa A
<b>PKI</b> <i>(Protein Kinase Inhibitor)</i>	Inhibidor de la proteína quinasa A
<b>PMI</b>	Proyección de máxima intensidad
<b>PMSF</b> <i>(PhenylMethylSulfonyl Fluoride)</i>	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
<b>PS</b> <i>(PhosphoSerine)</i>	Fosfoserina
<b>PT</b> <i>(PhosphoThreonine)</i>	Fosfotreonina
<b>RE</b>	Retículo Endoplásmico
<b>RPE1</b> <i>(Retinal Pigment Epithelium)</i>	Epitelio pigmentario retinal
<b>SDS</b> <i>(Sodium Dodecyl Sulfate)</i>	Dodecilsulfato sódico
<b>SDS-PAGE</b> <i>(sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
<b>siRNA</b> <i>(small interfering RNA)</i>	Pequeños ARN de interferencia

<b>Sp-Br-cAMP</b>	8-Bromoadenosín-3',5'-cíclic monofosforotioato, SP-isómero
<b>TBS</b> <i>(Tris-Buffered Saline)</i>	Tampón Tris salino
<b>TCA</b> <i>(Trichloroacetic acid)</i>	Ácido tricloroacético
<b>TGN</b> <i>(Trans Golgi Network)</i>	Red trans del Golgi
<b>TSS</b> <i>(Transformation and storage of bacterial cells in the Same Solution)</i>	Transformación de bacterias en un paso con TSS.
<b>VSV-G</b> <i>(Vesicular Stomatitis Virus protein G)</i>	Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b> <i>(Wild Type)</i>	Tipo silvestre
<b>YFP</b> <i>(Yellow Fluorescent Protein)</i>	Proteína fluorescente amarilla



# **INTRODUCCIÓN**



## CONTEXTUALIZACIÓN

### **TRANSPORTE VESICULAR**

El tráfico vesicular entre compartimentos de las rutas exocítica y endocítica es una de las características más significativas de la organización celular eucariota (Popoff *et al*, 2011). El incesante trasiego molecular entre los diferentes orgánulos que constituyen estas vías hace posible el funcionamiento coordinado de cada uno de ellos. No obstante, cada compartimento desempeña actividades propias, para lo cual posee una dotación específica de componentes endógenos. A fin de mantener la composición diferencial es obligado, por tanto, que las transferencias moleculares se realicen de forma selectiva. Además, el transporte entre dos orgánulos cualesquiera es siempre bidireccional, pues la maquinaria molecular encargada de catalizar y regular el tráfico en un sentido ha de retornar al compartimento donador para su reutilización (Bonifacino & Glick, 2004; Lee *et al*, 2004). Por otro lado, aunque es habitual referirse a los intermediarios de transporte como vesículas, no siempre tienen una morfología esférica. De hecho, las estructuras tubulares o pleomórficas son bastante frecuentes, si bien los componentes moleculares responsables de su formación, anclaje y fusión son similares (Bonifacino & Glick, 2004).

### **MAQUINARIA MOLECULAR**

En términos generales, la maquinaria de transporte consta de una serie de especies o clases moleculares, cuyos miembros son específicos, de forma que ejercen su actividad en un paso de transporte particular (Bonifacino & Glick, 2004).

**Receptores de carga.** Son proteínas transmembrana que por su dominio luminal interaccionan con las moléculas objeto del transporte, en tanto que por su región citosólica lo hacen con las proteínas de cubierta. Estas últimas los seleccionan y concentran para su introducción en un intermediario en formación (Strating & Martens, 2009). Viajan cíclicamente entre el compartimento donador y el receptor.

De acuerdo con las condiciones imperantes, unen al cargo en el primero y lo liberan en el segundo (Dancourt & Barlowe, 2010).

**Proteínas de cubierta.** Son proteínas citosólicas (Waters *et al*, 1991) que periódicamente se asocian y disocian de las membranas. Su unión a membranas se encuentra regulada por la actividad de GTPasas específicas. Forman complejos macromoleculares encargados, por un lado, de interactuar con los tallos citosólicos de los receptores de cargo contribuyendo a su agrupamiento y, por otro, deforman mecánicamente las bicapas para dar lugar a la formación de un intermediario. Una vez configurado éste, las proteínas de cubierta se desprenden (Salama & Schekman, 1995).

**Proteínas de anclaje (tethering).** Aproximan el intermediario de transporte al compartimento receptor, por lo que se hallan presentes en la superficie citosólica de ambas membranas (Cai *et al*, 2007; Lord *et al*, 2011). Algunas constan de varias subunidades que se disponen formando un complejo alargado y otras, en cambio, son proteínas filamentosas con abundantes segmentos helicoidales (coiled-coil) (Chia & Gleeson, 2014).

**SNAREs.** Estas proteínas integrales de membrana son responsables del reconocimiento y anclaje definitivo de la vesícula al orgánulo receptor. Las interacciones específicas entre la v-SNARE, presente en la membrana vesicular, y la t-SNARE de la membrana receptora constituyen el fundamento molecular para que las transferencias de materiales entre compartimentos sean selectivas. El complejo v-/t-SNARE una vez establecido es muy estable y conduce espontáneamente a la fusión de las membranas (Bonifacino & Glick, 2004).

**GTPasas.** Toda reacción de transporte depende de dos tipos de GTPasas. Unas regulan el ensamblaje de los complejos de cubierta a nivel de la membrana donadora, tal y como se mencionó anteriormente. Otras, pertenecientes a la familia Rab, controlan el anclaje de la vesícula al orgánulo receptor (Chavrier & Goud, 1999; Kawasaki *et al*, 2005).

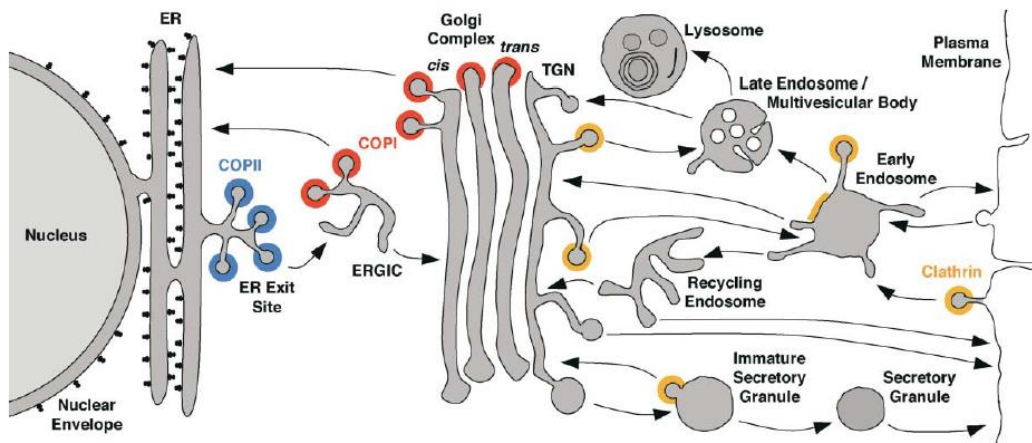
Ambas funcionan como interruptores moleculares, alternando entre un estado inactivo, en el que se encuentran libres en el citosol y unidas a GDP, y otro activo, en el que, tras sustituir el GDP por GTP, se anclan a la superficie citosólica

de las membranas mediante una modificación lipídica y/o exposición de un dominio hidrofóbico. El cambio conformacional depende de proteínas auxiliares que promueven la activación o inactivación de la GTPasa. Así, factores denominados GEF (Guanine Exchange Factor) catalizan el intercambio de GDP por GTP necesario para activar las GTPasas. La inactivación, por su parte, requiere de proteínas GAP (GTPase Activating Protein) que promueven la hidrólisis del GTP, pues la capacidad de las GTPasas para hacerlo por si mismas es muy limitada (Kawasaki *et al*, 2005).

Una vez activas y asociadas a membranas, las GTPasas interaccionan con proteínas efectoras, reclutándolas. Las GTPasas como Arf1 y Sar1, implicadas en procesos de evaginación de vesículas, atraen a sus respectivos complejos de cubierta. Las proteínas Rab, dependiendo de cada tipo particular, reclutan motores citoesqueléticos, factores de anclaje o bien activadores de t-SNARE.

## **TRÁFICO BIDIRECCIONAL RETÍCULO- GOLGI**

En la mayoría de los tipos celulares, la región de citoplasma comprendida entre el retículo endoplásmico (RE) y el complejo de Golgi se encuentra ocupada por numerosas vesículas y agrupaciones tubulovesiculares. Tales estructuras constituyen la manifestación morfológica de un intenso tráfico bidireccional (Fig.1)(Lee *et al*, 2004). El flujo anterógrado está encaminado al envío hacia Golgi de aquellas proteínas y lípidos que, tras su elaboración, continúan siendo procesados y/o han de ser distribuidos a distintos destinos. El transporte retrógrado recupera para el RE aquellos componentes endógenos (chaperonas, enzimas, etc.) que pudieran haber escapado durante el flujo anterógrado. Asimismo, hace retornar al orgánulo proteínas mal plegadas y la maquinaria (receptores de cargo, v-SNARE, etc.) necesaria para continuar con el transporte anterógrado. Los complejos de cubierta COPII y COPI son responsables de la formación de intermediarios para el transporte anterógrado y retrógrado, respectivamente (Bonifacino & Glick, 2004).



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

## FORMACIÓN DE LAS VESÍCULAS COPII

Las vesículas COPII que median el transporte anterógrado (Lee *et al*, 2004) se forman en regiones especializadas del RE denominadas sitios de salida o ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Sites)(Budnik & Stephens, 2009). Los ERES son subcompartimentos discretos, distribuidos aleatoriamente por todo el retículo, incluyendo la envoltura nuclear. Con anterioridad, las proteínas han sido plegadas con la ayuda de chaperonas y enzimas como la proteín disulfuro isomerasa. En el caso de proteínas oligoméricas, las cadenas polipeptídicas también se ensamblan previamente a su ingreso en los ERES. El control de calidad que rige en el retículo evita el acceso a los sitios de exportación de moléculas mal plegadas o ensambladas incorrectamente (Mezzacasa & Helenius, 2002). Aunque algunas proteínas de secreción extremadamente abundantes en el lumen del retículo como la albúmina pueden acceder a los ERES sin ser seleccionadas, no es lo habitual. En la mayoría de los casos, el complejo COPII funciona reconociendo a las moléculas y concentrándolas en los ERES. En este proceso, las proteínas transmembrana desempeñan un papel crucial. Pueden funcionar como cargo en sí mismas o bien

como receptores de cargo soluble, pues las proteínas lumbales no pueden ser reconocidas directamente por los componentes del complejo COPII (Miller & Barlowe, 2010; Sato & Nakano, 2007). En cualquier caso, sus tallos citosólicos son reconocidos por la subunidad sec24 del complejo COPII. Las señales de exportación varían, pero en algunos casos se trata de motivos diacídicos o dihidrofóbicos presentes en los dominios citosólicos y que se exponen una vez las proteínas se han plegado correctamente (Bonifacino & Glick, 2004; Kuehn *et al*, 1998).

La asociación de la cubierta COPII se inicia con la activación de la GTPasa Sar1. El factor GEF activador es Sec12, una proteína transmembrana endógena del RE, cuyo dominio citosólico cataliza la conversión de Sar1-GDP a la forma activa Sar1-GTP. De este modo, Sar1, hasta entonces citosólica, cambia de conformación exponiendo su dominio N-terminal, el cual posee una configuración en forma de  $\alpha$ -hélice anfipática, que le permite anclarse a la membrana. El hecho de que el factor intercambiador Sec12 se localice en la membrana del RE asegura que la activación de Sar1 tenga lugar en esta localización.

Como muchos otros complejos de cubierta, COPII consta de una capa externa y otra interna (D'Arcangelo *et al*, 2013; Sato & Nakano, 2007). La externa, constituida por copias del heterodímero Sec13-Sec31, tiene capacidad para polimerizar formando una especie de jaula esférica que esculpe la membrana y da forma a la vesícula de transporte. El dímero Sec23-Sec24 constituye la capa interna. Actúa como un adaptador que acopla la capa externa a la membrana, interviniendo en el reconocimiento y selección de las proteínas cargo (D'Arcangelo *et al*, 2013; Sato & Nakano, 2007). La asociación a las membranas es secuencial. En primer lugar, Sar1-GTP recluta al subcomplejo Sec23-Sec24 mediante interacción directa con la subunidad Sec23. Sec 24, por su parte, es la subunidad encargada de seleccionar a las proteínas transmembrana. Para ello dispone de varios huecos hidrofóbicos, lo que sugiere que una molécula de Sec24 podría unir varias moléculas cargo simultáneamente. Además, el hecho de que existan varias isoformas de Sec24 hace pensar que cada una de ellas podría reconocer un tipo diferente de señal de exportación (Miller & Barlowe, 2010; Sato & Nakano, 2007).

El complejo formado por las proteínas cargo más Sar1 y Sec23-Sec24 actúa como cebador favoreciendo el reclutamiento de Sec13-Sec31. La asociación de Sec13-Sec31 estimula entonces la actividad GAP de Sec23 y ello a su vez dispara la actividad GTPásica de Sar1. Al hidrolizar el GTP, Sar1 se inactiva, produciéndose su disociación (Sato & Nakano, 2007). Inicialmente el resto de componentes (subcomplejos Sec23-Sec24 y Sec13-Sec31) permanecerían unidos a la membrana, pero únicamente porque Sec24 se encuentra interaccionando con los dominios citosólicos de las proteínas transmembrana. Si el número de estas proteínas fuesen suficientes, se formarían nuevos complejos cebadores permitiendo la polimerización de Sec13-Sec31, generándose así la fuerza necesaria para deformar la membrana y producir una yema de evaginación (bud). Por el contrario, si el número de proteínas transmembrana cargo fuese escaso, los complejos cebadores no perdurarían y, por consiguiente, el proceso de evaginación quedaría abortado al no producirse la polimerización de Sec13-Sec31 (Sato, 2004; Sato & Nakano, 2007).

Se supone que las moléculas de Sar1-GDP disociadas son rápidamente reactivadas gracias a la presencia constante de Sec12 en la membrana del retículo. De ser así, durante la formación de la vesícula COPII Sar1 describiría un flujo continuo de asociación y disociación como consecuencia de la acción combinada de Sec12 y Sec23. Con cada asociación se irían generando nuevos complejos cebadores que, a su vez, capturarían a las proteínas cargo (Sato & Nakano, 2007).

Tras la formación de la yema (bud) de evaginación, se produce la escisión de la vesícula. Estudios recientes adjudican un papel relevante a Sar1 en este paso del proceso (Hariri *et al*, 2014; Long *et al*, 2010). Al parecer, los sucesivos ciclos de inserción y retracción de su hélice anfipática N-terminal en la membrana del cuello de la evaginación facilitarían la liberación de la vesícula (Bielli *et al*, 2005; Hariri *et al*, 2014; Lee *et al*, 2005a).



## COMPARTIMENTO INTERMEDIO ENTRE EL RETÍCULO Y GOLGI

### (ERGIC)

La cubierta COPII se desprende de las vesículas al poco tiempo de su formación. Se produce entonces la fusión homotípica de unas vesículas con otras para dar lugar a agrupaciones tubulovesiculares. Estas estructuras no tienen una forma definida y durante mucho tiempo se consideraron meros intermediarios de transporte. No obstante, la existencia de proteínas marcadoras propias (por ejemplo, la lectina ERGIC53) ha hecho que se les considere una estación más en la ruta secretora (Schweizer *et al*, 1990; Schweizer *et al*, 1991). Precisamente la denominación de compartimento intermedio ubicado entre el RE y el complejo de Golgi (ERGIC) hace referencia a esta consideración. Se trataría de un lugar preferente para el reconocimiento y recuperación de aquellas moléculas del retículo (proteínas mal plegadas, componentes endógenos) que accidentalmente abandonaron el orgánulo siguiendo el masivo flujo secretor y han de regresar a él. Por tanto, es un lugar clave en el que divergen los flujos moleculares anterógrado y retrógrado (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006).

Las opiniones difieren en cuanto al origen y evolución del ERGIC. Para algunos autores se trataría de un compartimento estable, que continuamente recibe intermediarios procedentes del retículo y del que, a su vez, parten vesículas de dos tipos: anterógradas con destino al cis-Golgi y retrógradas con componentes para ser devueltos al RE. Según este punto de vista, ERGIC tendría una dotación molecular propia y en su interior se llevarían a cabo reacciones diferentes a las realizadas tanto en el RE como en el Golgi (Appenzeller-Herzog & Hauri, 2006). Para otros, en cambio, se trataría de una colección de estructuras transitorias, surgidas a partir de la fusión de vesículas COPII y que, tras un progresivo proceso de maduración molecular y confluencia, se transformarían en cisternas cis del Golgi (Rabouille & Klumperman, 2005). Ambos modelos cuentan con evidencias experimentales a su favor.

Sea como fuere el compartimento ERGIC es un lugar preferente para la formación de las vesículas COPI.

## VESÍCULAS COPI: SIGNIFICACIÓN FUNCIONAL

La participación de las vesículas COPI en el transporte retrógrado desde Golgi y ERGIC hasta el RE ha quedado establecida a partir de estudios genéticos y funcionales (Cosson *et al*, 1998; Love *et al*, 1998). No obstante, su papel en el transporte anterógrado retículo-Golgi es aún objeto de discusión. La inhibición del ensamblaje de COPI detiene el flujo secretor a nivel de compartimento intermedio (Fullekrug *et al*, 1997), lo cual podría interpretarse como demostración de su implicación en el tramo ERGIC-Golgi. Por el contrario, podría tratarse de un efecto secundario derivado de la imposibilidad de reciclar los componentes del sistema COPII.

Las vesículas COPI se aislaron inicialmente a partir de fracciones de Golgi y, de hecho, *in situ* abundan en los alrededores de este orgánulo, motivo por el cual desde un principio se les asignó un papel destacado en el transporte intra-Golgi de moléculas cargo. Sin embargo, actualmente la mayoría de los autores consideran que, durante su procesamiento en Golgi, las moléculas cargo no abandonan las cisternas, sino que avanzan en su interior durante un proceso de maduración progresiva en dirección cis-trans (Rizzo *et al*, 2013). De ser así, durante la progresión cisternal, las vesículas COPI serían responsables de la constante reubicación de las proteínas endógenas del Golgi mediante transferencia retrógrada (Bonifacino & Glick, 2004). Sin embargo, la detección en las vesículas de moléculas cargo tanto para la vía anterógrada como retrógrada sugiere la existencia de diferentes poblaciones de vesículas COPI (Orci *et al*, 1997).

## VESÍCULAS COPI: COMPONENTES

**Coatómero.** El componente básico de la cubierta COPI es un complejo de 7 subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ) conocido como coatómero (Hsu & Yang, 2009). Su organización molecular y propiedades recuerdan a la cubierta de clatrina. A semejanza de ésta, se reconocen dos subcomplejos con distinta significación funcional. El tetrámero:  $\beta$ -COP,  $\gamma$ -COP,  $\delta$ -COP y  $\zeta$ -COP guarda relación estructural con el complejo de proteínas adaptadoras de las vesículas cubiertas de clatrina.

Por tal motivo, se considera que estaría implicado en la selección de moléculas cargo. El hecho de que las células posean diversas isoformas moleculares de componentes como  $\gamma$ -COP y  $\zeta$ -COP, hace pensar en la existencia de diferentes tipos de vesículas COPI; cada una de ellas, especializada en el transporte de un tipo de cargo (Yu *et al*, 2012). Por su parte, el trímero  $\alpha$ -COP,  $\beta'$ -COP y  $\varepsilon$ -COP presenta similitudes estructurales con las subunidades que forman la red de clatrina (Hsia & Hoelz, 2010; Lee & Goldberg, 2010).

**Arf1.** El factor 1 de ADP-ribosilación (Arf1) es una pequeña proteína con actividad GTPásica que desempeña un papel crucial en la formación de las vesículas COPI. El ensamblaje de la cubierta COPI viene precedido por la activación de Arf1 y su inserción en la superficie citosólica de las membranas. *In vitro*, Arf1 y el coatómero constituyen los componentes citosólicos esenciales y suficientes para la formación de este tipo de vesículas (Bremser *et al*, 1999; Reinhard *et al*, 1999; Spang *et al*, 1998). Sin embargo, *in vivo* Arf1 interviene en la formación de otros transportadores, como las vesículas cubiertas de clatrina. De hecho, Arf1 desempeña un papel análogo en el reclutamiento de adaptadores (complejos AP1, AP2, AP3 y AP4, además de las proteínas GGA) a nivel de TGN (trans Golgi network) y membrana plasmática (Kawasaki *et al*, 2005). Por tanto, la biogénesis de vesículas COPI a partir de las membranas del Golgi y ERGIC dependerá de una activación localizada y precisa en el tiempo de Arf1.

Durante su activación Arf1 experimenta un cambio conformacional que expone una hélice anfipática N-terminal. Ésta, además, se encuentra modificada con un ácido mirístico. El resultado es el anclaje estable de Arf1 a la membrana, desde donde recluta al coatómero. A diferencia del ensamblaje en dos pasos de COPII y otros complejos de cubierta, el coatómero se incorpora en bloque (Hara-Kuge *et al*, 1994). Se calcula que en la cubierta definitiva habría entre 3 y 4 moléculas de Arf1 por coatómero (Beck *et al*, 2009; Serafini *et al*, 1991). Los contactos moleculares detectados entre Arf1 y los componentes del coatómero son múltiples, estando implicadas las subunidades  $\beta'$ -COP,  $\beta$ -COP,  $\delta$ -COP,  $\varepsilon$ -COP, así como el dominio central de  $\gamma$ -COP (Sun *et al*, 2007; Zhao *et al*, 1997; Zhao *et al*, 1999). Además, a través de su extremo C-terminal, Arf1 interacciona con los

dominios citosólicos de ciertas proteínas de membrana como las p24 (Gommel *et al*, 2001).

**Complejo p24.** Uno de los componentes mayoritarios de las vesículas COPI es un complejo tetramérico de pequeñas (23-27 kDa) proteínas transmembrana tipo I que continuamente cicla entre el RE y el Golgi. Para ello, estas proteínas interaccionan con los complejos COPI y COPII a través de motivos presentes en sus tallos citosólicos (Strating & Martens, 2009). Se han propuesto dos funciones para este complejo. Por un lado, actuaría como receptor de cargo, especialmente de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol, facilitando su exportación desde el RE (Castillon *et al*, 2011; Muniz *et al*, 2000). Además, mediante sus interacciones con componentes del coatómero, intervendría en la formación de vesículas COPI. En particular, dímeros de p23 y p24 (pero no p25, p26 o p27) interaccionan con el dominio central de  $\gamma$ -COP (Bethune *et al*, 2006; Reinhard *et al*, 1999). Ello da lugar a un cambio conformacional de esta subunidad que, de algún modo, sería transmitido a  $\alpha$ -COP (Langer *et al*, 2008), iniciándose la polimerización de la cubierta (Reinhard *et al*, 1999). En suma, las evidencias indican que *in vivo* el complejo p24 y otras proteínas transmembrana como el receptor de la secuencia KDEL contribuirían de forma decisiva al ensamblaje de la cubierta COPI sobre la membrana, estabilizando los complejos cebadores que se forman durante el proceso (Aguilera-Romero *et al*, 2008; Cabrera *et al*, 2003).

**Moléculas Cargo.** Las moléculas transportadas por las vesículas COPI pertenecen a diferentes categorías funcionales: componentes endógenos del retículo endoplásmico que han de ser recuperados, maquinaria del transporte anterógrado para su reutilización en nuevas rondas de transporte e incluso proteínas mal plegadas no retenidas eficientemente por el control de calidad. Se han caracterizado algunas de las señales moleculares responsables de su inclusión en vesículas retrógradas (Dancourt & Barlowe, 2010). Es el caso de las proteínas transmembrana. La señal más extendida es la secuencia dilisina, K(X)KXX, presente en el extremo C-terminal de muchos receptores de cargo (Jackson *et al*, 1990). Otras proteínas endógenas del retículo presentan, en su lugar, un motivo diarginina, RXR, o difenilalanina. Todos ellos son reconocidos directamente por componentes del complejo COPI (Fiedler *et al*, 1996; Schutze *et al*, 1994). Las

proteínas solubles, por su parte, no tienen acceso directo a la maquinaria COPI, motivo por el cual su reconocimiento es indirecto. La mayor parte de las proteínas lumbinales presentan en su extremo C-terminal la secuencia KDEL (HDEL en levaduras) que es reconocida por un receptor específico (Janson *et al*, 1998). El receptor es una proteína integral de membrana que interacciona con COPI a través de su extremo citosólico C-terminal en una forma dependiente de fosforilación (Cabrera *et al*, 2003).

## **VESÍCULAS COPI: FORMACIÓN**

### ArfGEFs

Como se mencionó anteriormente la activación de Arf1 es un requerimiento estricto para la asociación a las membranas del coatómero y posterior evaginación de la vesícula COPI (Fig.2). La activación de Arf1 depende de factores GEF específicos (Popoff *et al*, 2011). Las células animales poseen una amplia variedad de GEFs, si bien todos ellos tienen en común la presencia de un dominio Sec 7, altamente conservado, responsable de catalizar el intercambio de nucleótidos sobre Arf1. Aquellos que residen en Golgi pertenecen a dos grupos proteicos: GBF1 y BIG (en levaduras Gea1/2p y Sec7p, respectivamente). Se trata de proteínas evolutivamente relacionadas, muy parecidas en su secuencia de aminoácidos y presentes en todos los eucariotas. BIG1 y BIG2 se localizan en la región trans del Golgi, TGN (trans Golgi network) y endosomas, desconociéndose el mecanismo o los factores implicados en su reclutamiento (Mansour *et al*, 1999; Shin *et al*, 2004; Shinotsuka *et al*, 2002). Por el contrario, GBF1 se concentra en el compartimento cis del Golgi y ERGIC. Su asociación a estas membranas depende de la presencia en las mismas de Rab1 (Monetta *et al*, 2007) y fosfatidilinositol-4-fosfato (Dumaresq-Doiron *et al*, 2010).

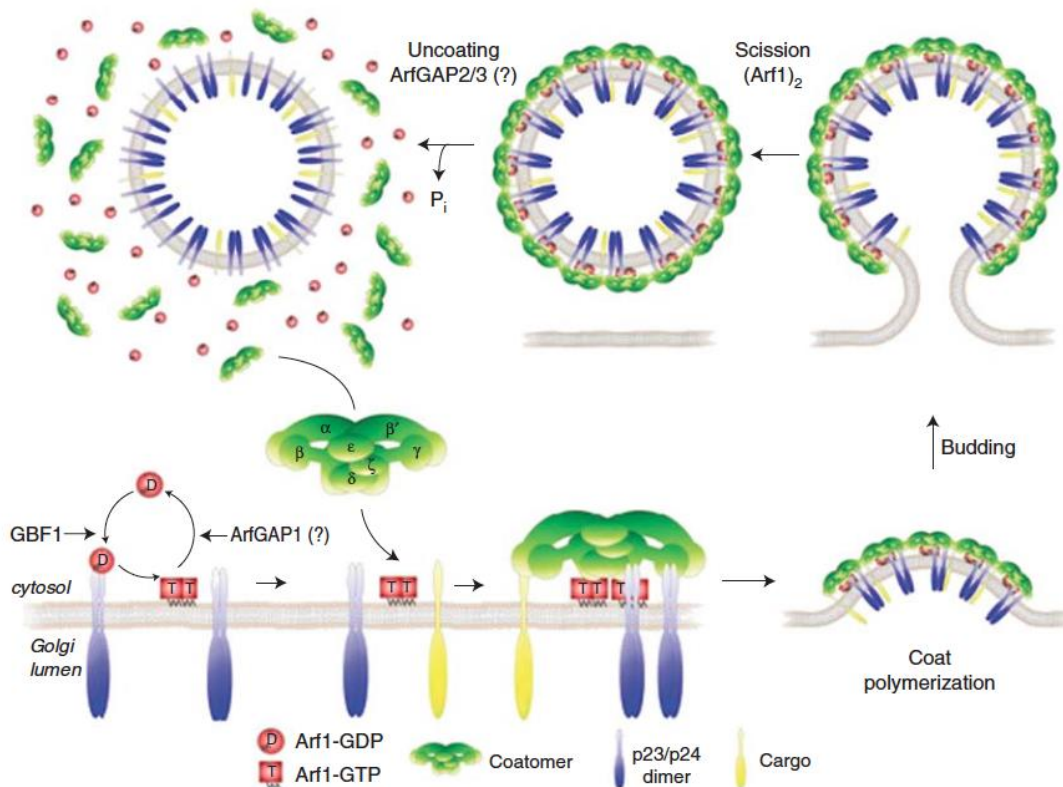
### ArfGAPs

Antes de fundir con la membrana del orgánulo diana la vesícula COPI ha de perder la cubierta. Según el modelo actualmente vigente el proceso se

desencadena cuando una proteína GAP activa a Arf1 para que hidrolice el GTP, de modo que ésta retorna a su conformación inicial, se disocia de la membrana y, con ella, el resto de componentes de la cubierta (Popoff *et al*, 2011). Las ArfGAPs descritas hasta el momento se caracterizan por presentar en su dominio catalítico un motivo en dedo de zinc al que invariablemente le sigue un residuo de arginina (CX<sub>2</sub>CX<sub>16</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>4</sub>R) (Cukierman *et al*, 1995). En humanos hay más de 30 miembros agrupados en 10 subfamilias. El grupo más conocido es aquel relacionado con el transporte vesicular. En mamíferos lo componen 3 miembros (ArfGAP1, ArfGAP2 y ArfGAP3), en levaduras 2 (Gcs1p y Glo3p). Los estudios realizados indican que ninguna de estas formas moleculares es esencial. Así, en mamíferos fue necesario suprimir simultáneamente la síntesis de las tres ArfGAPs para conseguir un bloqueo del transporte retrógrado Golgi-RE equivalente al conseguido con la inhibición de la expresión de  $\beta$ -COP (Saitoh *et al*, 2009). En levaduras, ambas proteínas Gcs1p y Glo3p son igualmente necesarias para el transporte retrógrado (Poon *et al*, 1999).

No obstante, existen importantes diferencias estructurales, cinéticas y funcionales entre las formas moleculares. Por ejemplo, la actividad de ArfGAP1, pero no la de ArfGAP2 o ArfGAP3, parece estar regulada por la curvatura de la membrana, de forma que se incrementa conforme disminuye el diámetro de las vesículas (Bigay *et al*, 2005). Ello se correlaciona con la existencia en ArfGAP1 de dos dominios sensores de curvatura, denominados ALPS (ArfGAP1 Lipid Packing Sensor) (Ambroggio *et al*, 2010; Mesmin *et al*, 2007), capaz de insertarse en membranas y del que carecen tanto ArfGAP2 como ArfGAP3. Las tres proteínas pueden interactuar directamente con moléculas cargo como v-SNAREs y componentes del coatómero, pero lo hacen de forma distinta. Glo3p y los ortólogos humanos ArfGAP 2 y ArfGAP3 forman complejos cebadores dependientes de Arf1 (Rein *et al*, 2002; Weimer *et al*, 2008). ArfGAP1 también facilita la interacción del cargo con la cubierta, pero en una forma independiente de Arf1 y sin que sea necesaria su actividad catalítica (Lee *et al*, 2005b). Es más, la afinidad por el coatómero de ArfGAP1 es inferior a la mostrada por ArfGAP2 y ArfGAP3 quienes, sin embargo, poseen menor actividad intrínseca (Kliouchnikov *et al*, 2009; Luo *et al*, 2009; Weimer *et al*, 2008). En realidad, las actividades de estas últimas son

mucho más dependientes del coatómero (Kliouchnikov *et al*, 2009; Weimer *et al*, 2008), con cuyas subunidades interaccionan de forma directa en las vesículas evaginadas *in vitro* a partir de liposomas o membranas nativas de Golgi (Frigerio *et al*, 2007; Weimer *et al*, 2008). *In vivo*, el comportamiento dinámico de ArfGAP2 y ArfGAP3 se asemeja más al del coatómero que el de ArfGAP1 (Kartberg *et al*, 2010). En resumen, las evidencias indican que las formas ArfGAP2/3 serían las implicadas en el desprendimiento de la cubierta COPI una vez formada la vesícula. ¿Qué función desempeñaría entonces ArfGAP1?



**Figura 2. Etapas en la formación de vesículas COPI.** El primer paso que acontece es la activación de Arf1 en las membranas a consecuencia de la acción del factor GEF (GBF1). Seguidamente, se recluta el coatómero hacia las membranas y la polimerización de esta cubierta deforma la membrana y desencadena la escisión de la vesícula (Popoff *et al*, 2011).





## INTRODUCCIÓN

### **ArfGAP1**

Hace 20 años Randazzo y Khan demostraron la existencia, en extractos de cerebro bovino, de una proteína capaz de incrementar considerablemente la actividad GTPasa de Arf1 (Randazzo & Kahn, 1994). La proteína en cuestión fue purificada y descrita como un polipéptido de 49 kDa (Makler *et al*, 1995). Inicialmente se la denominó Arf1GAP, pero al identificarse posteriormente otras GAPs para Arf1 se optó por el nombre de ArfGAP1. Fue la primera proteína de esta clase en ser clonada y caracterizada en términos moleculares. Su homólogo en levaduras es Gcs1p.

**Organización molecular.** La estructura de ArfGAP1 consta de dos partes bien distintas. En la mitad N-terminal se localiza un dominio catalítico responsable de estimular la hidrólisis de GTP por parte de Arf1. Según los análisis efectuados con formas truncadas, comprendería los aminoácidos 6-136 (Goldberg, 1999). Esta zona presenta el característico motivo en dedo de zinc. Si bien las mutaciones a nivel de los residuos de cisteína suprimen la actividad GAP, ello es resultado de una alteración que afecta a la estructura general de la proteína. En realidad, el bucle de 16 aminoácidos de este motivo está ubicado en el centro de la proteína y no es probable que participe en la catálisis. En cambio, la arginina situada 5 aminoácidos más allá del dedo de zinc (en posición 50) está presente en todas las ArfGAPs y es esencial para la actividad catalítica (Szafer *et al*, 2000). La mitad carboxilo terminal no presenta ningún tipo de motivo proteico conocido. Previsiblemente contiene un alto porcentaje de regiones no estructuradas. En esta zona se localizan determinantes responsables de su asociación al complejo de Golgi (Yu & Roth, 2002) y posiblemente a través de ella se produzcan las interacciones con otras moléculas (Parnis *et al*, 2006).

**Regulación.** Se han analizado en detalle los efectos que sobre la actividad catalítica de ArfGAP1 ejercen el coatómero, las proteínas cargo y los fosfolípidos.

Originalmente se describió que el coatómero en solución estimula 1000 veces la actividad de ArfGAP1 (Goldberg, 1999). Estos datos han sido cuestionados porque en el estudio se utilizaron formas moleculares del sustrato (forma truncada

de Arf1, unida a GDP y no miristoilada) y de la enzima (dominio catalítico en lugar de la proteína completa) que no serían las habituales en condiciones fisiológicas (Mandiyani *et al*, 1999). No obstante, otros autores, utilizando membranas de Golgi (Szafer *et al*, 2001) o liposomas (Bigay *et al*, 2003), han detectado un efecto estimulador del coatómero sobre ArfGAP1, aunque mucho menor al descrito inicialmente. Otros, por el contrario, no han observado tal estimulación (Szafer *et al*, 2000). El efecto estimulador del coatómero es más evidente en el caso de ArfGAP2 y ArfGAP3. Como se mencionó anteriormente, estas proteínas tienen más afinidad por el coatómero que ArfGAP1 y, además, su actividad basal es menor (Luo *et al*, 2009; Luo & Randazzo, 2008). No obstante, es posible que las condiciones establecidas en los ensayos *in vitro* no sean las óptimas. En particular, un exceso de coatómero podría secuestrar Arf1-GTP impidiendo su utilización por ArfGAP1 (Spang *et al*, 2010).

No menos claro es el efecto de las proteínas cargo. En un principio, los dominios citosólicos de las proteínas p23 inhibieron a la actividad ArfGAP1 (Goldberg, 2000; Lanoix *et al*, 2001; Weiss & Nilsson, 2003). Estudios posteriores, sin embargo, han mostrado que péptidos correspondientes al dominio citosólico de las subunidades p23 y p25 incrementan la actividad catalítica de ArfGAP1 y ArfGAP2 (Spang *et al*, 2010). ArfGAP1 también interacciona con el receptor de la secuencia KDEL (Cabrera *et al*, 2003; Yang *et al*, 2005) y con la proteína denominada BARS durante la fisión de las vesículas COPI (Yang *et al*, 2005).

Los estudios pioneros de Randazzo y Khan indicaron que la actividad ArfGAP era estimulada por PIP2 (Randazzo & Kahn, 1994). No existen, sin embargo, evidencias directas de que la unión de un lípido o derivado lipídico concreto pueda ejercer una acción reguladora. Se ha demostrado que la interacción con membranas nativas favorece la actividad catalítica, debido quizás a que en estas condiciones ArfGAP1 se encontraría próximo a su sustrato natural, Arf1-GTP, previamente asociado a aquellas. La presencia en la hemicapa externa de las membranas de espacios o huecos entre moléculas de fosfolípidos favorece tanto el reclutamiento como la actividad ArfGAP1 (Antonny *et al*, 1997; Bigay *et al*, 2005). Igual sucede con las membranas que presentan una elevada curvatura positiva (Bigay *et al*, 2003). Esto último hace pensar en una incorporación preferente de

ArfGAP1 y, por consiguiente inactivación de Arf1, a nivel de la región central de la yema de evaginación. Por el contrario, ArfGAP1 no sería reclutado a nivel de la región del cuello de la evaginación cuya curvatura es negativa, predominando en esta localización el ensamblaje de COPI promovido por Arf1 (Bigay *et al*, 2003; Holthuis & Burger, 2003). El mencionado dominio ALPS es una corta secuencia de aminoácidos que en solución no parece hallarse especialmente estructurada. Sin embargo, en contacto con membranas cuyos lípidos no se encuentren densamente empaquetados, experimentaría un cambio conformacional, transformándose en una hélice anfipática capaz de insertarse entre ellos (Bigay *et al*, 2005).

**Inactivador/Efactor de Arf1.** Inicialmente ArfGAP1 fue caracterizado como un factor necesario para la desactivación de Arf1, puesto que esta proteína prácticamente carece de actividad GTPásica. Así, su sobreexpresión ocasiona la desorganización del complejo de Golgi, un efecto considerado como la consecuencia de una inactivación generalizada de Arf1 (Aoe *et al*, 1997). En estas condiciones también se produce la redistribución de las membranas de Golgi en el RE, dando lugar a un fenotipo similar al inducido por el compuesto Brefeldin A (BFA) (Aoe *et al*, 1997). Ambos resultados concuerdan, puesto que BFA inhibe a los GEFs encargados de activar Arf1 y, de este modo, ocasiona un exceso de Arf1-GDP (Robineau *et al*, 2000). Una situación similar tendría lugar tras la sobreexpresión de ArfGAP1 en la que también se produciría un incremento de los niveles de Arf1-GDP. Asimismo, las observaciones realizadas en células que expresan una forma mutada de Arf1 (Arf1-Q71L) permanentemente unida a GTP (Zhang *et al*, 1994) concuerdan con aquellas obtenidas tras la expresión de una variante de ArfGAP1 (ArfGAP1-R50K) con escasa actividad catalítica (Szafer *et al*, 2000). Es más, el silenciamiento conjunto de las tres formas moleculares humanas dio lugar a un alto nivel de Arf1-GTP en las células silenciadas (Saitoh *et al*, 2009). En levaduras, la toxicidad generada por un exceso de Arf1 pudo ser reducida mediante la sobreexpresión de diferentes ArfGAPs (Zhang *et al*, 2003). Por último, estudios *in vitro* han mostrado la capacidad del dominio catalítico de ArfGAP1 para inhibir en una forma dependiente de dosis la formación de vesículas COPI, si bien no ha quedado establecido que este efecto se deba a inestabilidad de la cubierta (Reinhard *et al*, 2003). Todos estos resultados, por tanto, apoyarían un papel

antagónico de las ArfGAP en general, y de ArfGAP1 en particular, con respecto a Arf1.

Por el contrario, otros datos indican que ArfGAP1 además de promover la inactivación de Arf1, podría funcionar como efector de este último. En levaduras, la insuficiencia de Arf1 pudo ser contrarrestada mediante la sobreexpresión de varias ArfGAPs (Gcs1p, Glo3p, Age1p y Age2p) (Zhang *et al*, 1998). Si estas últimas funcionasen únicamente como reguladores negativos de Arf1, su sobreproducción no debería tener efecto alguno o incluso podría exacerbar las consecuencias letales de la deficiencia de Arf1, pero no sería de esperar un rescate de las células afectadas como en realidad ocurrió (Zhang *et al*, 1998). En el mismo estudio se describieron efectos celulares (sensibilidad a flúor) similares tras la eliminación de Gcs1 o de Arf1, sugiriendo la participación de ambos en un proceso común en lugar de realizar acciones opuestas (Zhang *et al*, 1998). Otra evidencia proviene de la identificación de complejos cebadores durante el ensamblaje de la cubierta COPI. En este sentido, las formas ArfGAP2/3 y el ortólogo Glo3p de levaduras interactúan con Arf1 y con alguna de las v-SNAREs dando lugar a la formación de un complejo trimérico que posteriormente promueve la asociación del coatómero (Rein *et al*, 2002; Weimer *et al*, 2008). En ausencia de Glo3p, por ejemplo, no se produce tal unión. En definitiva, dependiendo de la etapa exacta durante la génesis de la vesícula de transporte, las ArfGAPs podría atenuar o bien mediar las acciones de Arf1. Si así fuese, su actividad debería estar sometida a un estricto control que permitiera, en un momento dado, una interacción no catalítica con Arf1 a fin de ejercer su acción efectora y, en otro momento, una interacción catalítica que pudiese término a la señalización por Arf1.

**Papel en la formación de vesículas COPI.** En principio, la actividad desempeñada por ArfGAP1 en el tráfico vesicular estaría ligada a la regulación de Arf1. El ciclo de intercambio de GDP por GTP y posterior hidrólisis de este último gobierna la dinámica de asociación/disociación a membranas de proteínas de cubierta como COPI. Hasta el punto de que clásicamente se ha considerado al complejo Arf1-GTP como el factor aglutinador necesario para mantener la asociación de las proteínas de cubierta a la membrana. Por el mismo motivo, la hidrólisis de GTP por parte de Arf1 constituye un requerimiento estricto para el desprendimiento de la cubierta.

La función primaria de ArfGAP1 consistiría, por tanto, en inducir la hidrólisis de GTP por parte de Arf1 a fin de desencadenar la disociación de la cubierta. Este esquema implica la existencia de mecanismos precisos que regulen espacial y temporalmente la actividad de ArfGAP1. Por ejemplo, la hidrólisis de GTP no debe ocurrir prematuramente, sino una vez la cubierta ha quedado organizada. De otro modo, el proceso no culminaría con la formación de un intermediario de transporte.

Se han propuesto dos modelos sobre la regulación temporal y espacial de la actividad ArfGAP1 y, por ende, de la propia Arf1. De acuerdo con uno de ellos, la actividad catalítica de ArfGAP1 sería estimulada por el coatómero e inhibida por el cargo. El fundamento para esta idea es la observación de que *in vitro* COPI acelera la hidrólisis del GTP (Goldberg, 1999; Szafer *et al*, 2001), en tanto que la inhiben péptidos correspondientes al dominio citosólico de las proteínas p24 (Goldberg, 2000; Lanoix *et al*, 2001). Así pues, durante el proceso de selección del cargo la actividad ArfGAP1 estaría inhibida. Ello permitiría que Arf1-GTP fuese estable y favoreciese la polimerización de la cubierta, evitándose una disociación prematura de ésta. El otro modelo explicaría la regulación espacial. Se basa en la asociación selectiva de ArfGAP1 a las regiones altamente curvadas de las membranas gracias a sus dominios sensores ALPS (Mesmin *et al*, 2007). En una vesícula en formación, ello ocasionaría una mayor actividad GTPásica a nivel de la zona positivamente curvada de la yema de evaginación en comparación con el cuello. A nivel de este último seguiría produciéndose la incorporación de Arf1 y coatómero, de forma que estos componentes difundirían lateralmente hacia la parte curva durante la selección del cargo. En todo caso, ambos modelos asignan un papel regulador negativo para ArfGAP1 sobre Arf1.

Por otro lado, la captación de moléculas cargo en las vesículas COPI en formación requiere la hidrólisis del GTP. De hecho, las vesículas formadas *in vitro* en presencia del análogo no hidrolizable GTP $\gamma$ S no contienen cargo anterógrado o retrógrado (Lanoix *et al*, 1999; Nickel *et al*, 1998) y tampoco aquellas formadas *in vivo* en células que expresan la forma Arf1-Q71L permanentemente unida a GTP (Pepperkok *et al*, 2000). Estas observaciones indican que ArfGAP1 debería participar en la selección de las moléculas a transportar. Tal y como se describió

anteriormente, todas las ArfGAPs implicadas en transporte vesicular tienen capacidad para formar complejos cebadores con moléculas cargo como ciertas v-SNARES y estos complejos sirven luego para atraer al coatómero. Es de destacar que en el caso de ArfGAP1 las interacciones tienen lugar con independencia de Arf1 y sin que sea necesaria su actividad catalítica, estando implicadas regiones de su molécula distintas al dominio catalítico (Lee *et al*, 2005b).

Trabajando con componentes puros Hsu y cols. demostraron un efecto estimulador directo de ArfGAP1 sobre la producción de vesículas COPI a partir de membranas de Golgi (Yang *et al*, 2002). Estos autores comprobaron mediante inmunoblot e inmunolocalización la permanencia de ArfGAP1 en la cubierta de las vesículas evaginadas, en una cantidad estequiométrica comparable a la de  $\beta$ -COP. En este mismo estudio, Arf1 no fue detectado en las vesículas (Yang *et al*, 2002). Otros autores han descrito además un efecto activador de ArfGAP1 sobre la polimerización del coatómero en solución (Shiba *et al*, 2011). En base a estas observaciones se ha propuesto que ArfGAP1 constituiría un componente integral de la cubierta COPI. Arf1, por su parte, sería el catalizador que iniciaría el ensamblaje de la misma, pero no formaría parte de ella. De hecho, *in vivo* las proteínas de cubierta continúan asociadas a la membrana algún tiempo después de la disociación de Arf1 (Presley *et al*, 2002). Supuestamente permanecerían como un entramado polimérico, mantenido mediante múltiples interacciones laterales entre ellas y con los dominios citosólicos de las moléculas cargo. En los análisis proteómicos efectuados de diferentes poblaciones de vesículas no se ha detectado Arf1, pero tampoco ArfGAP1 (Borner *et al*, 2006; Gilchrist *et al*, 2006). No obstante, la idea de que ArfGAP1 es un constituyente estequiométrico de la cubierta COPI ha sido fuertemente cuestionada por Wieland y cols. Para estos autores, la detección de ArfGAP1 en las vesículas evaginadas *in vitro* es un artefacto producido tal vez como consecuencia de una fragmentación accidental de las membranas de Golgi a las cuales previamente se habría unido inespecíficamente la proteína a través de sus dominios ALPS (Beck *et al*, 2009).

La fisión es otra parte del proceso de formación vesicular en el que ArfGAP1 podría estar implicada. Típicamente en los ensayos *in vitro* a partir de subfracciones de Golgi no llegan a liberarse vesículas completas, sino que el

proceso queda detenido en un paso previo a la fisión. Al microscopio electrónico suelen observarse numerosas yemas (buds) cubiertas unidas a las membranas donadoras (Weidman *et al*, 1993) o, en el mejor de los casos, perfiles vesiculares que permanecen ligados a aquellas mediante filamentos proteicos (Orci *et al*, 1998). Es posible desencadenar la escisión final mediante agitación mecánica, exposición a alta concentración salina o incubación con ArfGAP1 y palmitoil-CoA. Este último resultado fue el punto de partida para caracterizar a BARS (Brefeldin A ADP-ribosylated substrate) como factor necesario para la liberación de las vesículas COPI. ArfGAP1 y BARS interaccionan de forma directa para desencadenar la fisión de las vesículas en una reacción en la que funciona como cofactor palmitoil-CoA (Yang *et al*, 2005). Se desconoce cómo ocurriría exactamente, pero la golgina denominada GMAP210 podría ser relevante en este contexto. GMAP210 establece puentes de conexión entre una membrana curvada como puede ser la vesicular y otra plana al interaccionar con fosfolípidos de la primera y con Arf1 en la segunda (Drin *et al*, 2008). Se ha propuesto que la hidrólisis de GTP estimulada por ArfGAP1 destruiría la interacción de GMAP210 con Arf1 y ello ocasionaría la liberación de la vesícula. Sin embargo, recientemente Wieland y cols. han demostrado que la escisión no requiere hidrólisis de GTP (Adolf *et al*, 2013) y es obra únicamente de la acción combinada de dímeros de Arf1 y del propio coatómero (Beck *et al*, 2011).

Finalmente, el papel que ArfGAP1 desempeña en el desprendimiento de la cubierta merece ser matizado. Son numerosas las pruebas experimentales que han establecido esta función. La más significativa es quizás el hecho de que la adición de ArfGAP1 recombinante o su dominio catalítico dio lugar a la disociación de la cubierta presente en vesículas COPI originadas a partir de liposomas y componentes puros (Reinhard *et al*, 2003). Asimismo, la sobreexpresión de ArfGAP1 en células intactas ocasiona la disociación desde el Golgi de Arf1 y del coatómero (Liu *et al*, 2005). No obstante, a la luz de recientes hallazgos, ArfGAP1 no sería el único factor implicado. El complejo de anclaje (*tethering*) Dsl1 interviene en el transporte retrógrado Golgi-RE e interacciona directamente con las subunidades  $\alpha$  y  $\delta$  del coatómero. En levaduras, la eliminación de este complejo da lugar a la acumulación de vesículas cubiertas COPI, indicando su

participación en el desprendimiento de esta cubierta (Zink *et al*, 2009). Como se comentó anteriormente la disociación *in vivo* de la cubierta COPI no ocurre inmediatamente tras el desprendimiento de Arf1. Sin embargo, cuando se examinó la forma mutada Arf1-Q71L tanto ésta como las subunidades del coatómero permanecieron irreversiblemente asociadas a las membranas (Presley *et al*, 2002). Así pues, la hidrólisis de GTP por parte de Arf1 es un requisito estricto para su propia disociación y la del coatómero, pero no necesariamente ha de ser el factor desencadenante en último término.

**Otras actividades funcionales.** ArfGAP1 es una molécula estructuralmente compleja y cabe la posibilidad de que sus funciones no se limiten exclusivamente a la regulación del tráfico vesicular. Como se describió previamente la mitad C-terminal (aminoácidos 142-415) contiene múltiples dominios que apenas han sido caracterizados. En este sentido, es interesante destacar su posible implicación en el mantenimiento del citoesqueleto de actina. Así se deduce de las observaciones llevadas a cabo con la forma homóloga Gcs1p. En *Saccharomyces cerevisiae* la organización de la red de actina depende de esta proteína que *in vitro* fue capaz de estimular directamente su polimerización (Blader *et al*, 1999). En mamíferos, en cambio, la expresión de una forma truncada de ArfGAP1 carente de actividad catalítica inhibió la adherencia y migración de las células. Un fragmento de 65 aminoácidos localizado en el extremo C-terminal es responsable de este efecto que sitúa a ArfGAP1 en la lista de reguladores de la red de actina, por delante de la GTPasa Rac1 (Siu *et al*, 2011).



## ANTECEDENTES

Nuestro grupo estudia las repercusiones funcionales de la asociación de proteína quinasa A (PKA) a las membranas del complejo de Golgi en células de mamíferos. Con anterioridad hemos demostrado que PKA interviene en el mantenimiento de la organización cisternal del Golgi (Mavillard *et al*, 2010), en su biogénesis (Bejarano *et al*, 2006) y en las actividades de transporte desarrolladas por este orgánulo (Cabrera *et al*, 2003; Muniz *et al*, 1996; Muniz *et al*, 1997). Con el fin de determinar los fundamentos moleculares de estas acciones llevamos a cabo experimentos de fosforilación *in vitro* consistentes en la incubación de membranas de Golgi purificadas con subunidades catalíticas de PKA. Las moléculas fosforiladas fueron posteriormente caracterizadas mediante análisis proteómico. Entre los sustratos identificados destacó ArfGAP1, un factor clave en el tráfico vesicular entre el RE y el Golgi. Como se ha expuesto, el papel funcional exacto de ArfGAP1 en la formación de las vesículas COPI es incierto. Asimismo, su relación con Arf1 y otras moléculas relevantes para el transporte es actualmente objeto de discusión, siendo varios los modelos propuestos para explicar su actividad y regulación. Por todo ello, decidimos analizar la fosforilación de ArfGAP1 por parte de PKA con el fin de poder arrojar alguna luz al debate planteado sobre esta proteína. En primer lugar, intentamos identificar el lugar o lugares objeto de fosforilación y, posteriormente, determinar la repercusión funcional de tal modificación.

Es de destacar que la fosforilación de ArfGAP1 ya fue descrita con anterioridad en estudios previos. Así, la caseína quinasa I fosforila un lugar no determinado del dominio no catalítico y, según los autores, esta modificación podría influir en su asociación a membranas (Yu & Roth, 2002). Más sorprendente es la fosforilación por parte de la quinasa LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2). Esta es una proteína neuronal de gran tamaño que ha sido relacionada con la enfermedad de Parkinson, puesto que sus mutaciones parecen tener efecto causal tanto en la variedad esporádica como en la familiar, autosómica dominante. Consta de varios dominios, incluyendo uno GTPásico y otro con actividad quinasa. En dos estudios independientes se ha demostrado un efecto recíproco entre ambas proteínas (Stafa *et al*, 2012; Xiong *et al*, 2012). ArfGAP1 se une a LRRK2 para estimular su actividad GTPásica y, por tanto, actuaría como GAP de esta última.

Pero además es sustrato de la actividad quinasa presente en LRRK2, con la particularidad de que esta fosforilación inhibe su actividad GAP (Xiong *et al*, 2012). Tales estudios estimularon nuestro interés por establecer el papel que la fosforilación en general, y la catalizada por PKA en particular, pudiera tener sobre la funcionalidad de ArfGAP1.

# **OBJETIVOS**



A tenor de la situación en la que se encuentra el estudio de la proteína ArfGAP1, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

- Caracterizar funcionalmente a ArfGAP1. Analizar tanto su implicación en el tráfico retrógrado ejerciendo de inactivador de Arf1 como otras posibles funciones que no estuvieran relacionadas con el tráfico intracelular.
- Estudiar la regulación de ArfGAP1 y sus modificaciones post-traduccionales a consecuencia de otras enzimas celulares.

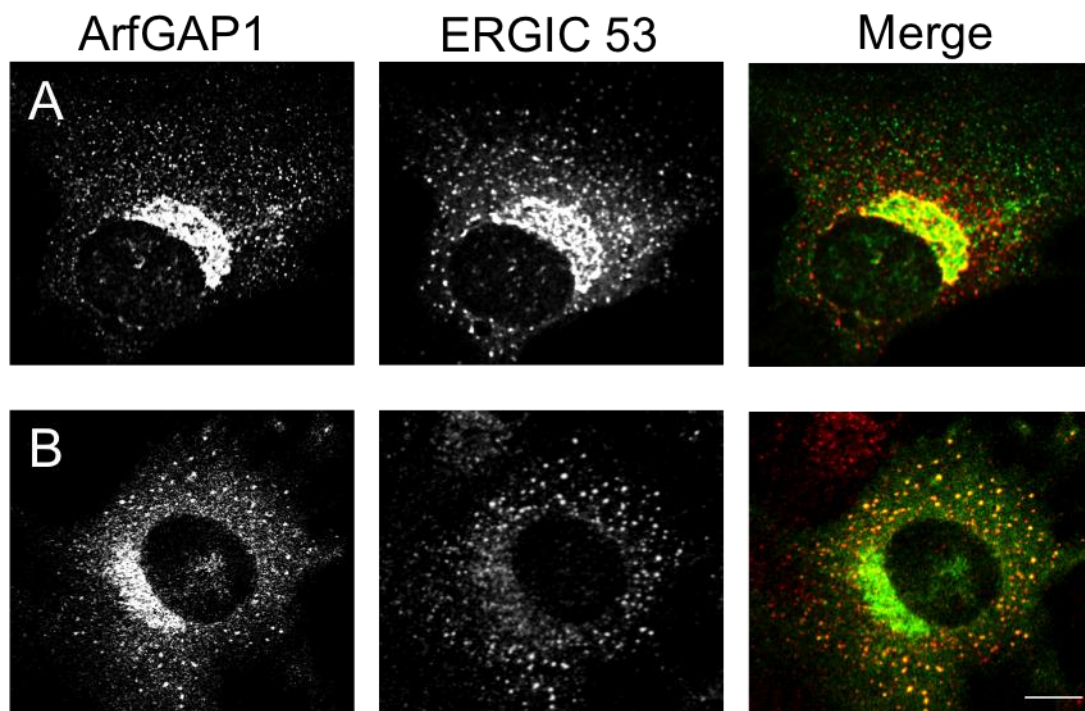


# **RESULTADOS**





En principio, ArfGAP1 es una proteína soluble sintetizada por ribosomas libres en el citosol. Sin embargo, tras su elaboración, se asocia a membranas, de forma que en una célula de mamíferos típica suele encontrarse localizada en diferentes estructuras subcelulares. Así, cuando llevamos a cabo su detección mediante inmunofluorescencia indirecta en células de retina RPE1 observamos que mayoritariamente se encuentra concentrada en un área perinuclear correspondiente a la ubicación del complejo de Golgi (Fig. 3A). Además, ArfGAP1 se localizó en una serie de estructuras puntiformes distribuidas por todo el citoplasma. A tenor de la tinción obtenida con un anticuerpo contra la proteína marcadora ERGIC53, tales estructuras se corresponden en su mayor parte con el llamado compartimento intermedio (Fig. 3A), una estación en la ruta secretora situada entre el RE y el Golgi. Este modelo de distribución intracelular pondría de manifiesto la participación de ArfGAP1 en el transporte vesicular entre ambos orgánulos.

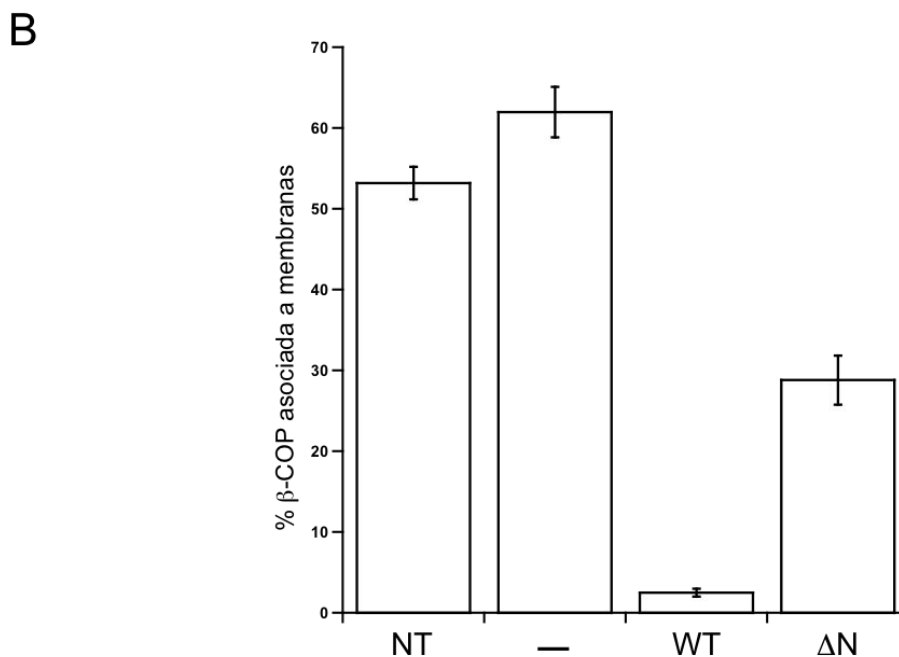
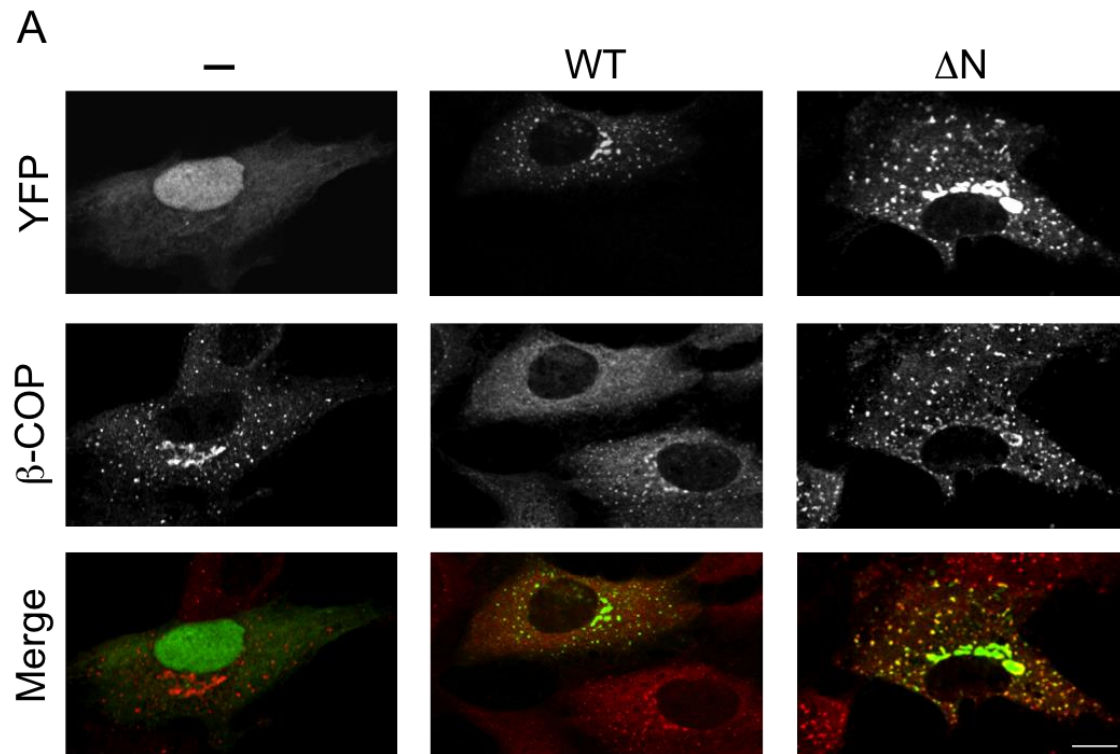


**Figura 3. Detección de ArfGAP1 en células animales.** Las células RPE1 fueron transfectadas con un plásmido conteniendo la secuencia ArfGAP1-YFP (**B**) o, por el contrario, con el vector sin inserto (**A**). Tras la fijación con paraformaldehído, fueron procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo primario dirigido contra ERGIC53 (ERGIC), una proteína marcadora del compartimento intermedio situado entre el RE y el Golgi. Las células en **A** fueron además incubadas con anticuerpo primario contra ArfGAP1 humana a fin de detectar la proteína endógena. Barra: 10 $\mu$ m.

## **ArfGAP1-YFP**

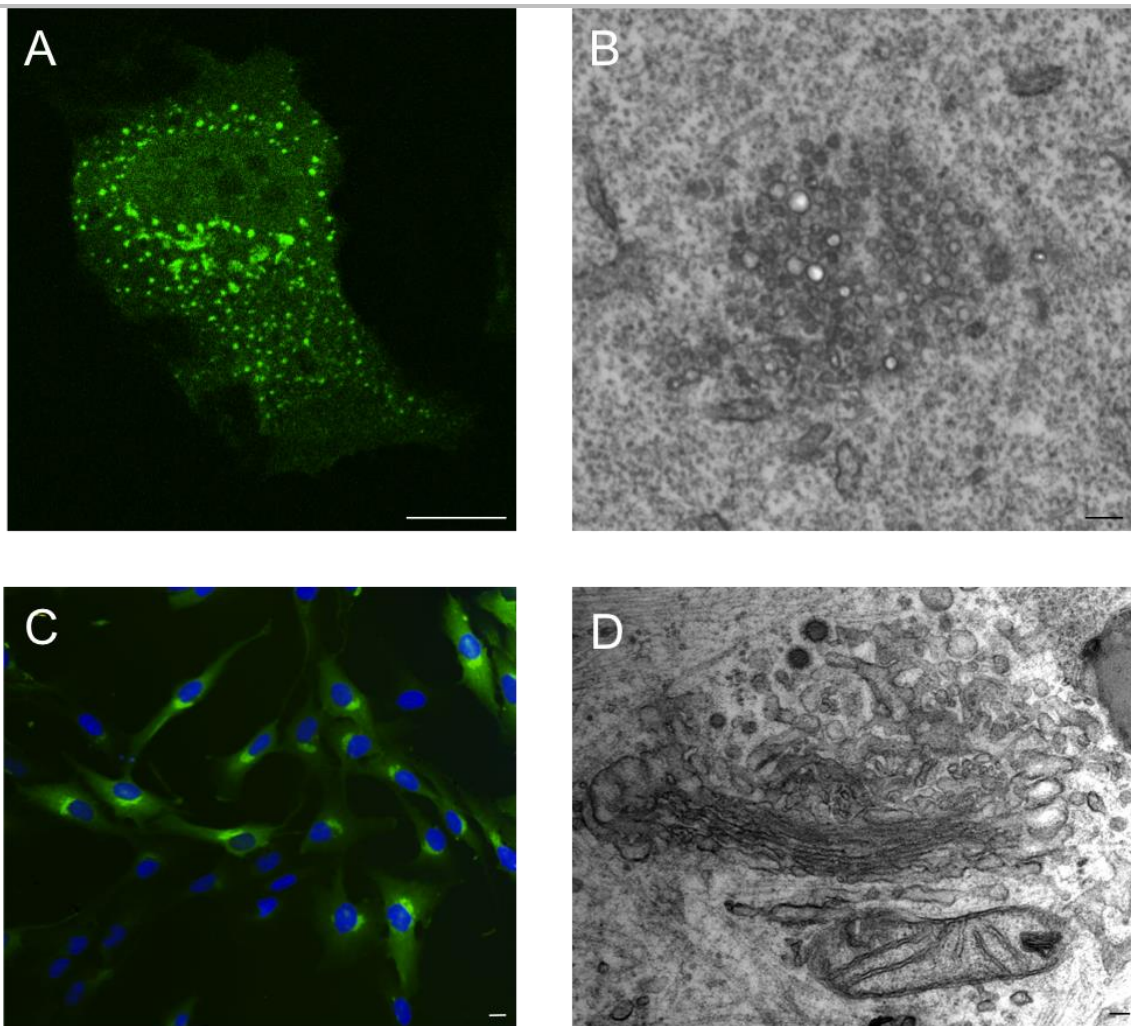
Con el fin de analizar el papel funcional de ArfGAP1, empleamos una construcción molecular formada por la secuencia codificadora de la proteína de rata fusionada en su extremo C-terminal a la proteína fluorescente YFP. Las células humanas RPE1 transfectadas con el plásmido que codifica para esta construcción mostraron un modelo de distribución similar al de la proteína endógena. Esto es, ArfGAP1-YFP apareció concentrada a nivel del complejo de Golgi y del compartimento intermedio retículo-Golgi (ERGIC). La localización a nivel ERGIC fue en este caso mucho más evidente debido al carácter fluorescente de la proteína expresada (Fig. 3B). Además, ocasionalmente observamos parte de la proteína asociada a la cara citosólica de la membrana plasmática, una localización apenas detectada en el caso de la forma endógena.

Según el modelo establecido para la formación de las vesículas de transporte COPI, ArfGAP1 induce la hidrólisis de GTP por parte de Arf1, lo cual ocasiona la disociación de este factor y, por ende, del resto de componentes de la cubierta COPI. En estudios previos se ha determinado que la actividad catalítica de ArfGAP1 reside en la mitad N-terminal (aminoácidos 6-136) (Goldberg, 1999). Para determinar si la forma molecular ArfGAP1-YFP es o no catalíticamente activa, analizamos los efectos derivados de su expresión sobre la localización de  $\beta$ -COP, un componente del complejo de cubierta COPI. En células no transfectadas o expresando simplemente YFP, una fracción considerable (>50%) de  $\beta$ -COP endógeno apareció asociado a las membranas del complejo de Golgi y del compartimento ERGIC, coincidiendo en su distribución con la propia ArfGAP1 (Fig. 4). Sin embargo, en las células que expresaron la forma ArfGAP1-YFP la mayor parte de  $\beta$ -COP se localizó disperso por el citoplasma (Fig. 4A). De hecho, en la cuantificación correspondiente comprobamos que <5% de la tinción para  $\beta$ -COP permaneció asociada a membranas intracelulares tras la expresión moderada de ArfGAP1-YFP (Fig. 4B). Por el contrario, la expresión de una forma truncada carente del dominio catalítico ( $\Delta$ NArfGAP1-YFP) no indujo la disociación completa de  $\beta$ -COP (Fig. 4A). En este caso, casi una tercera parte de la proteína permaneció asociada a membranas (Fig. 4B).



**Figura 4. Efecto de la expresión de ArfGAP1 sobre la localización intracelular de  $\beta$ -COP.** Células RPE1 fueron transfectadas o no (NT) con plásmidos que codifican para la construcción ArfGAP1-YFP silvestre (WT) o bien carente del extremo N-terminal ( $\Delta N$ ), así como con el vector YFP sin inserto (-). **(A)** Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo contra  $\beta$ -COP. Barra: 10 $\mu$ m. **(B)** La fluorescencia de  $\beta$ -COP asociada a membranas intracelulares fue determinada y representada como porcentaje de la fluorescencia total debida a esta proteína. Los datos (media  $\pm$  sem) son media de al menos 12 determinaciones.

Los resultados anteriores mostraron la utilidad experimental de la forma molecular ArfGAP1-YFP, por cuanto se trata de una versión fluorescente de la proteína endógena, con la misma distribución subcelular que ésta y capaz de realizar su actividad característica. No obstante, observamos que la sobreexpresión de esta forma ectópica indujo la desorganización del complejo de Golgi como consecuencia precisamente de una actividad catalítica exacerbada. La Fig. 5A muestra la imagen fluorescente de una célula con un nivel de expresión elevado, de forma que ArfGAP1-YFP aparece concentrada en grandes acúmulos distribuidos por el citoplasma. Al microscopio electrónico de transmisión comprobamos que tales acúmulos se corresponden con agrupaciones de vesículas no cubiertas (Fig. 5B). Suponemos que, en condiciones de sobreexpresión, ArfGAP1-YFP ocasionaría la fragmentación de la cinta de Golgi y posterior vesicularización de sus cisternas. Como quiera que durante las expresiones transitorias el porcentaje de células mostrando este fenotipo era variable, decidimos obtener una población celular homogénea que expresase establemente la construcción de forma moderada. De este modo, la viabilidad y el comportamiento de las células no estaría comprometido por la producción masiva de una proteína foránea. Las células utilizadas para el resto del estudio fueron las que se muestran en la Fig. 5C. El complejo de Golgi de estas células posee la organización cisternal típica (Fig. 5D).

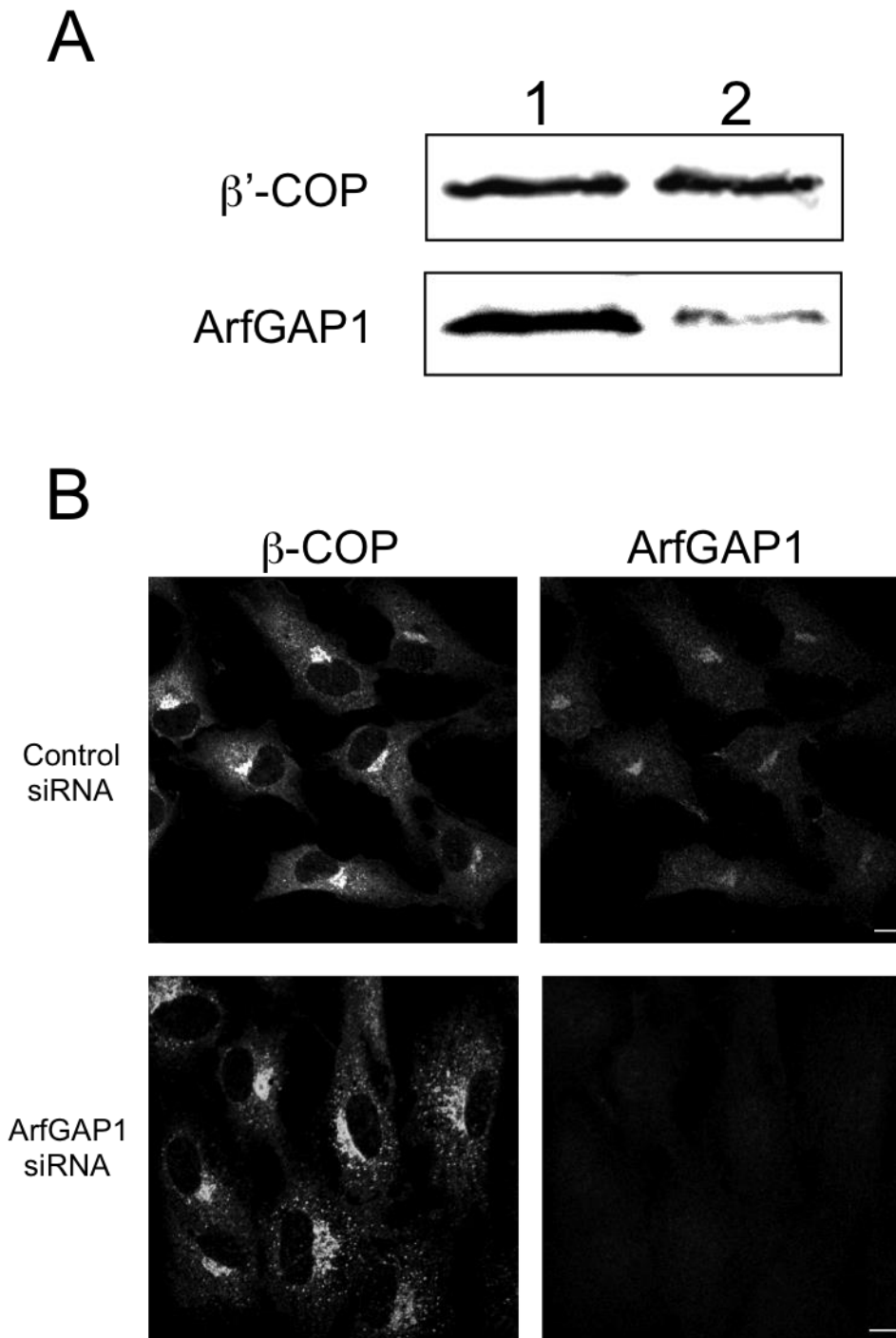


**Figura 5. Efecto de la expresión de ArfGAP1 sobre la organización del complejo de Golgi.** Las células RPE1 fueron transfectadas con la construcción ArfGAP1-YFP y sometidas **(C-D)** o no **(A-B)** a selección a fin de obtener una población estable. Tras la fijación, fueron directamente observadas al microscopio de fluorescencia **(A, C)** o, alternativamente, procesadas para microscopía electrónica de transmisión **(B, D)**. Barras: 10 $\mu$ m **(A, C)**, 100 nm **(B,D)**.

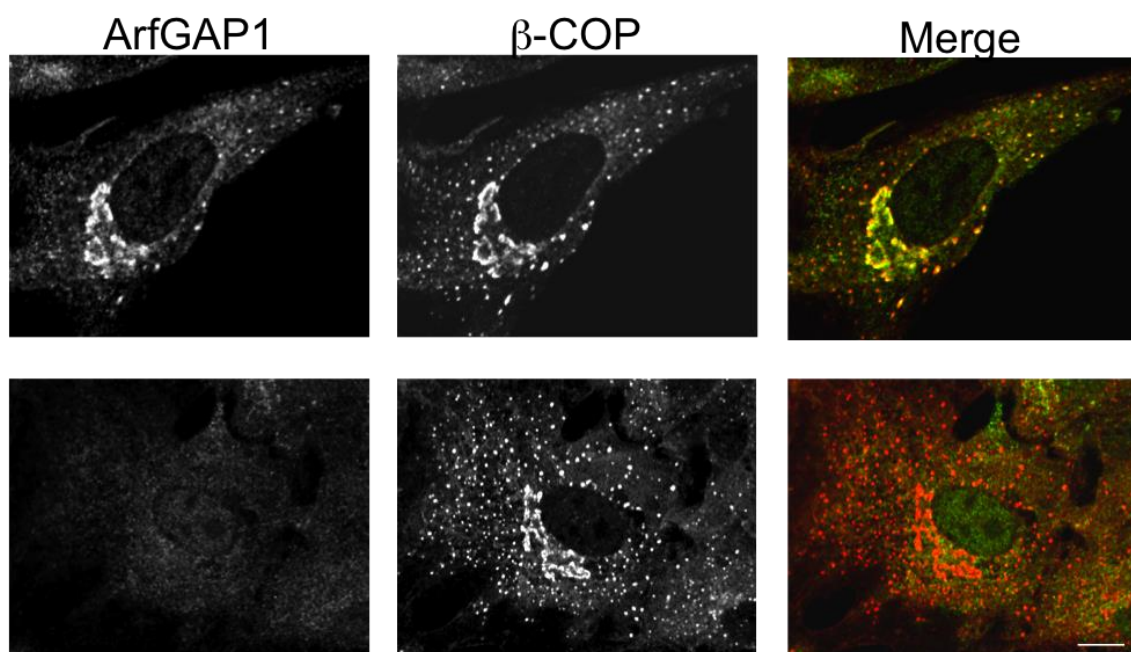
## FACTORES RESPONSABLES DE LA ASOCIACIÓN DE ArfGAP1 A MEMBRANAS

### Relación con los Componentes de las Cubiertas COPI

Como se indicó anteriormente, el modelo de distribución intracelular de ArfGAP1 es semejante al de  $\beta$ -COP y otros componentes del complejo COPI de proteínas de cubierta. En ambos casos, las proteínas se encuentran concentradas en el complejo de Golgi y elementos ERGIC, así como dispersas por el citosol. Es posible, por tanto, que su asociación a membranas estuviese coordinada de algún modo. Para comprobarlo, utilizamos una mezcla de oligonucleótidos del tipo siRNA con el que inhibir específicamente la síntesis de ArfGAP1 endógena. Como muestra la Fig. 6A, las células tratadas con este reactivo mostraron una reducción de más del 90% (91,1%) en la expresión de ArfGAP1 en tanto que la producción de  $\beta$ '-COP, otro componente del complejo COPI, no se vio afectada. Como control negativo se utilizaron células incubadas con una combinación de oligonucleótidos irrelevantes y, como era de esperar, los niveles de expresión de ambas proteínas, ArfGAP1 y  $\beta$ '-COP, no se afectaron (Fig. 6A). Precisamente en estas células controles, y tal y como se mencionó anteriormente, la localización de ArfGAP1 coincide con la de  $\beta$ -COP (Fig. 6B). Es de destacar que en el caso de  $\beta$ -COP su localización no cambió tras el silenciamiento de ArfGAP1, permaneciendo asociada a Golgi y ERGIC (Fig. 7). De acuerdo con estos datos la asociación a las membranas intracelulares del complejo macromolecular denominado coatómero, del que las subunidades  $\beta$  y  $\beta$ ' forman parte, tiene lugar independientemente del reclutamiento de ArfGAP1.



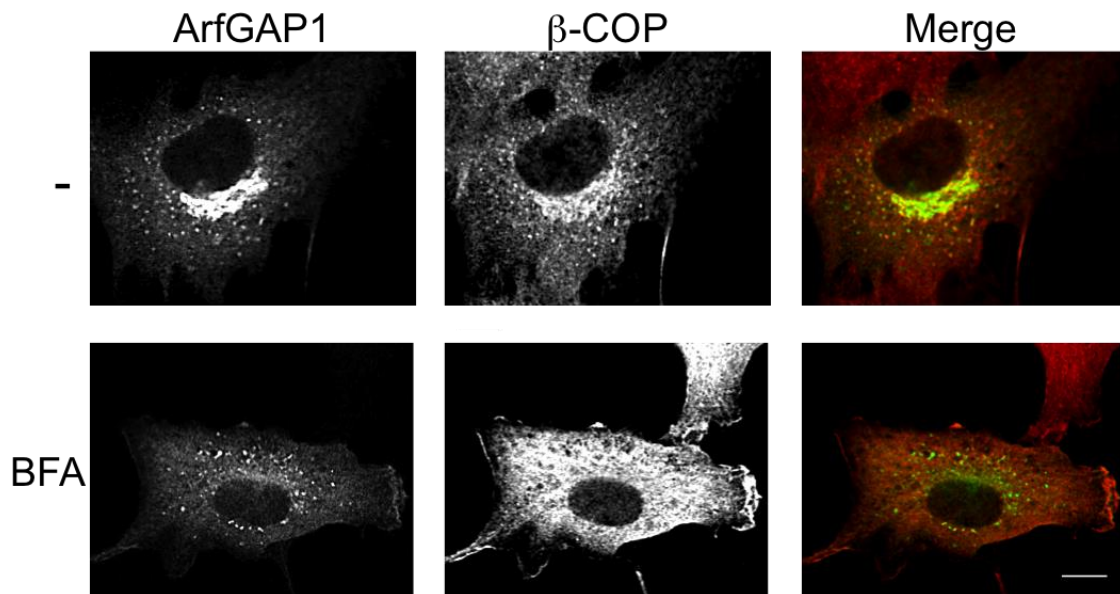
**Figura 6. Inhibición de la expresión de ArfGAP1 mediante siRNA.** Células RPE1 no transfectadas fueron incubadas durante 72 horas con una mezcla de oligonucleótidos del tipo siRNA especialmente diseñados para inhibir la expresión de ArfGAP1 humana (2). Como control negativo, otras células fueron incubadas en forma similar con una mezcla de oligonucleótidos irrelevantes (1). **(A)** Las células fueron lisadas y los extractos de proteínas totales procesados para SDS-PAGE e inmunoblot con anticuerpos contra ArfGAP1 y  $\beta'$ -COP. **(B)** Las células intactas fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra ArfGAP1 y  $\beta$ -COP. Barra: 10 $\mu$ m.



**Figura 7. Efecto del silenciamiento de ArfGAP1 sobre la localización de  $\beta$ -COP.** Células RPE1 no transfectadas fueron tratadas con una combinación de siRNA específicos para la variante humana de ArfGAP1, o bien con una mezcla de oligonucleótidos irrelevantes. Posteriormente fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra ArfGAP1 y  $\beta$ -COP. Barra: 10 $\mu$ m.

Para comprobar si, por el contrario, la asociación de ArfGAP1 depende del reclutamiento previo de la cubierta COPI analizamos los efectos del tratamiento de las células con brefeldin A (BFA). Este agente ocasiona la inhibición del factor GEF responsable de la activación de Arf1 (Robineau *et al*, 2000), lo cual da lugar a la disociación de todos los componentes COPI. Así, tras la exposición a BFA,  $\beta$ -COP apareció disperso homogéneamente por todo el citoplasma celular. Por otro lado, en las células incubadas con BFA la asociación de ArfGAP1 al Golgi disminuyó drásticamente, pero no así su adscripción a ERGIC (Fig. 8). En definitiva, a juzgar por estos datos el reclutamiento de ArfGAP1 se llevaría a cabo de forma diferencial, siendo dependiente de Arf1 en el caso del complejo de Golgi, pero no así su incorporación a elementos del ERGIC.

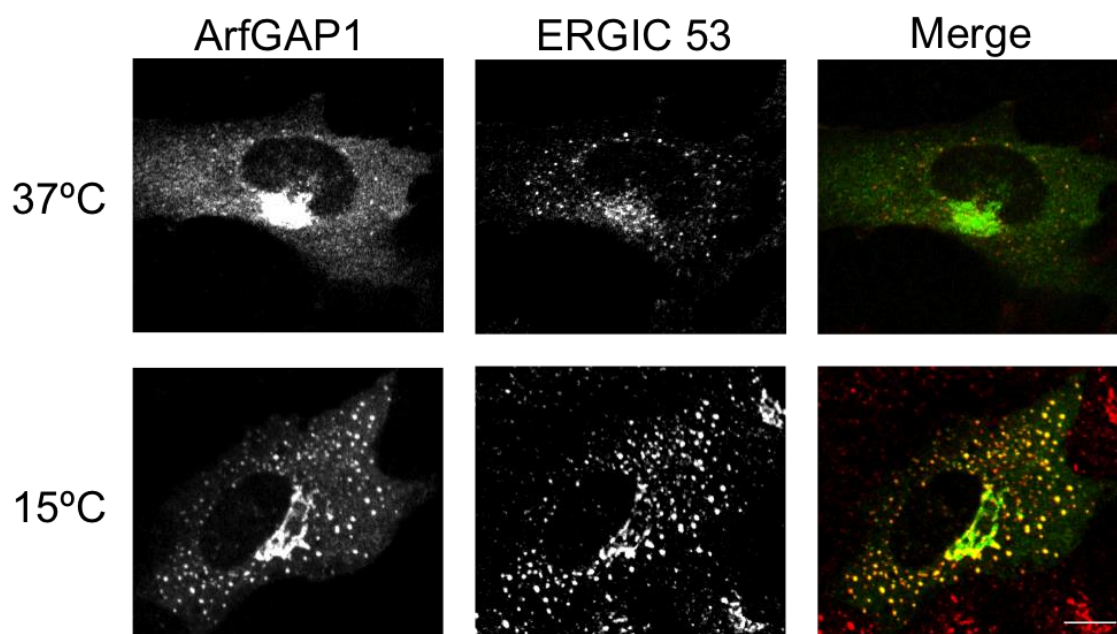




**Figura 8. Efecto del tratamiento con Brefeldin A (BFA) sobre la localización de ArfGAP1.** Las células RPE1 expresando ArfGAP1-YFP fueron incubadas (+) o no (-) durante 1 hora a 37°C con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BFA en medio mínimo. Posteriormente, fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra  $\beta\text{-COP}$ . Barra: 10 $\mu\text{m}$ .

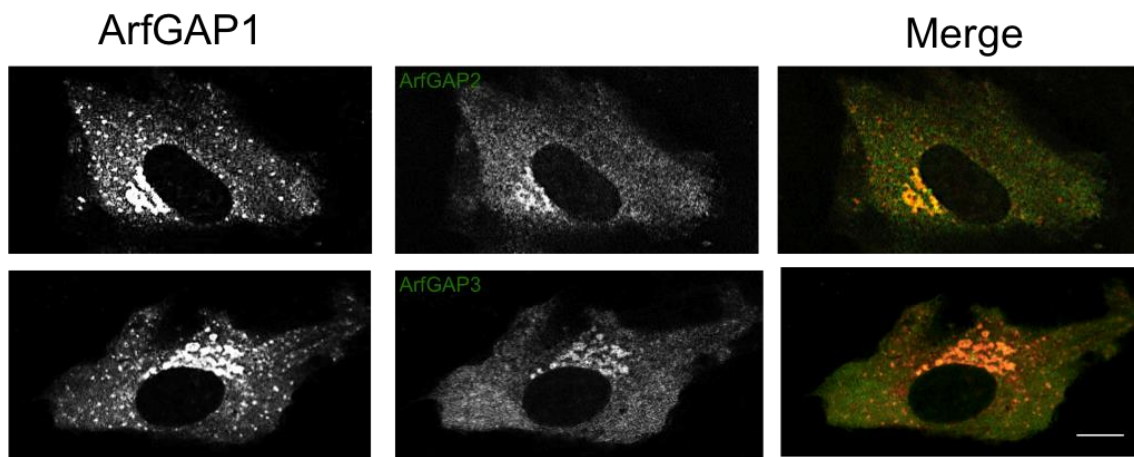
### Localización a nivel de ERGIC

La presencia de ArfGAP1 a nivel del compartimento ERGIC es una de las observaciones más relevantes del presente estudio. Tratándose de un lugar preferente en el reconocimiento y devolución al retículo de receptores y moléculas endógenas, la presencia de ArfGAP1 concuerda con el papel asignado a esta proteína en la formación de vesículas de reciclaje COPI. Sin embargo, son escasos los elementos ERGIC que en condiciones normales muestran ArfGAP1 en su superficie citosólica. Comprobamos, no obstante, que tras la incubación de las células a baja temperatura (15°C, 2-3 h), el tamaño y número de los elementos ERGIC se incrementó considerablemente, produciéndose una redistribución de ArfGAP1-YFP hacia los mismos (Fig. 9).



**Figura 9. Efecto de la incubación a baja temperatura sobre la localización de ArfGAP1.** Células RPE1 expresando ArfGAP1-YFP fueron incubadas en medio completo conteniendo 20 mM Hepes durante 3 horas a 37°C o bien a 15°C. Las células fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra la proteína ERGIC 53. Barra: 10µm.

Por otro lado, tal y como se comentó en Introducción, hay distintas proteínas capaces de ejercer funcionalmente como GAP de Arf1. Especial interés tienen ArfGAP2 y ArfGAP3, puesto que la forma ortóloga en levaduras (denominada Glo3p) es la que al parecer está implicada en la formación de vesículas COPI (Lewis *et al*, 2004). El ortólogo en levaduras de ArfGAP1 (denominado Gsc1p), en cambio, podría ejercer funciones adicionales (Weimer *et al*, 2008). La expresión transitoria de formas fluorescentes de ArfGAP2 y ArfGAP3 reveló su localización exclusiva en Golgi y citosol (Fig. 10). Ni siquiera durante la expansión del ERGIC a 15°C estas proteínas se asociaron a elementos de este compartimento (Fig. 10). Por tanto, la adscripción a ERGIC es una característica de la variante molecular ArfGAP1.



**Figura 10. Comparación de los modelos de distribución intracelular de diferentes isoformas de ArfGAP.** Las células RPE1 fueron cotransfectadas con plásmidos que codifican para ArfGAP1-YFP y una de las formas ArfGAP2/ArfGAP3 unidas a GFP. 48 h post-transfección las células fueron incubadas a 15°C durante 3 horas, fijadas y observadas al microscopio. Barra 10µm.

## Dominios de Interacción con Membranas

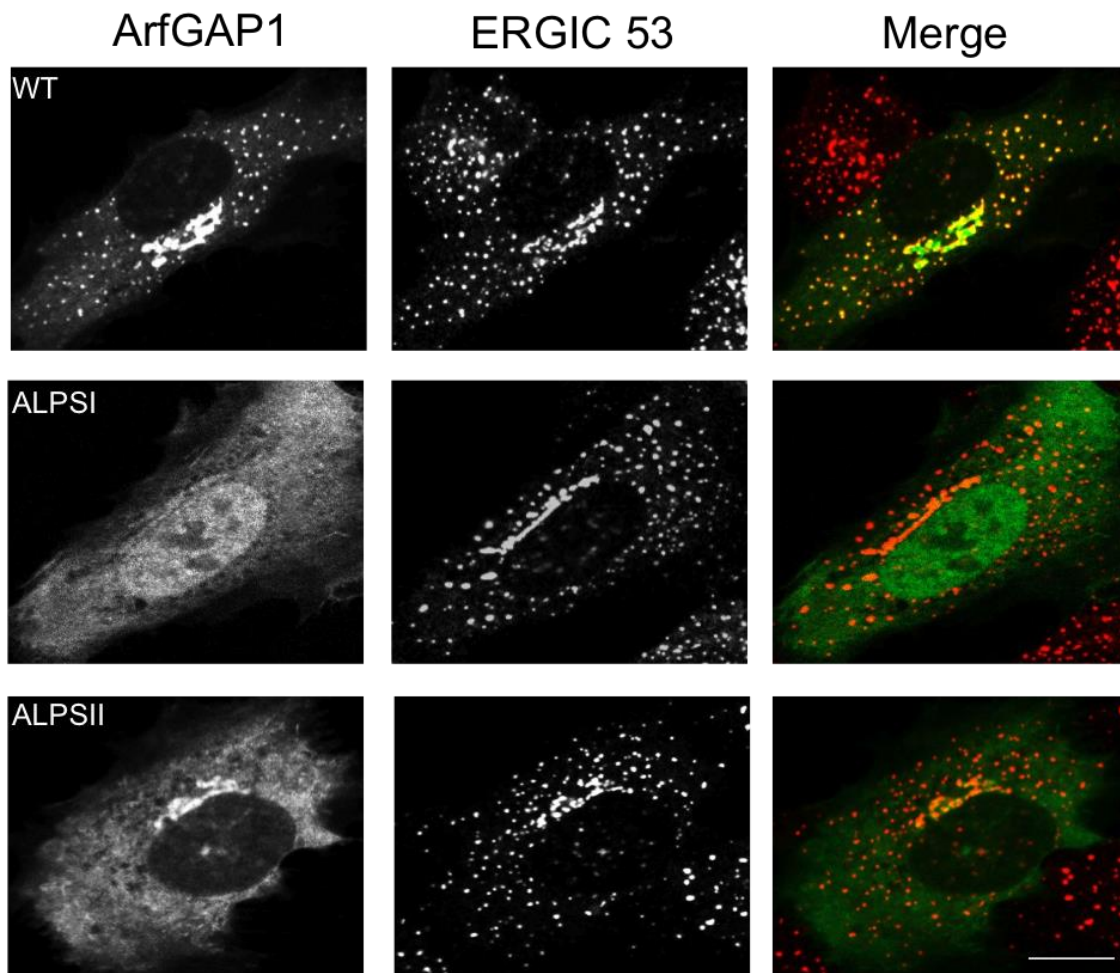
Diferentes estudios han mostrado que la asociación a Golgi depende de una región central en la proteína que, descrita inicialmente como una zona extensa con una longitud superior a los 100 aminoácidos (Yu & Roth, 2002), progresivamente ha sido reducida a un segmento de apenas 10-40 aminoácidos, según el tipo de análisis realizado (Bigay *et al*, 2005; Parnis *et al*, 2006). En cualquier caso, se trata de un dominio poco estructurado en solución, si bien al interactuar con membranas o liposomas que presentan lípidos laxamente empaquetados se inserta entre ellos formando una hélice anfipática en la que los residuos de serina y treonina forman la superficie hidrofílica. Este dominio se denomina ALPS (ArfGAP1 lipid packing sensor), pues se supone que es responsable del reconocimiento de aquellas zonas en las que las membranas presentan curvatura positiva, tales como la parte central de las vesículas o yemas en formación. En estos lugares los lípidos están menos densamente empaquetados y es donde preferentemente se produciría la asociación de ArfGAP1 para catalizar la inactivación Arf1. En cambio, en el cuello de las evaginaciones, con curvatura negativa, se incorporaría Arf1 y nuevas proteínas de cubierta, pero no ArfGAP1 (Bigay *et al*, 2005).

De acuerdo con este modelo, introdujimos varias mutaciones puntuales en el dominio ALPS con el fin de impedir la inserción en membranas de ArfGAP1-YFP. En particular, aminoácidos hidrofóbicos como metionina 204, leucina 207, triptófano 211 y fenilalanina 214 fueron sustituidos por alanina (Fig. 11A). La proteína resultante dejó de estar asociada a Golgi y ERGIC y, en su lugar, apareció disociada por todo el citoplasma (Fig. 11B). Por tanto, este resultado confirma la importancia de la configuración secundaria del dominio ALPS para la correcta ubicación de la proteína. Por otra parte, analizamos también la importancia de un segundo dominio ALPS que abarcaría el segmento comprendido entre los residuos 263 y 295 (Fig. 11A). De nuevo, realizamos cambios en la secuencia de aminoácidos de este tramo, de forma que impidiésemos su configuración helicoidal. En este caso, la forma mutada pudo asociarse al Golgi, pero no al compartimento ERGIC (Fig. 11B). Así pues, los requerimientos moleculares para el reclutamiento de ArfGAP1 desde el citosol a las membranas del complejo de Golgi y del compartimento ERGIC son diferentes. En concreto, la asociación a ERGIC es independiente de las proteínas que forman las cubiertas COPI (Fig. 8) y requiere ambos dominios ALPS (Fig. 11). En cambio, sólo el primero de estos dominios (aminoácidos 198-234) es imprescindible para su incorporación a las membranas del Golgi, siendo esta reacción dependiente además de Arf1, puesto que la asociación no se produce en presencia de BFA, un inhibidor de la activación de Arf1.

A

MASPRTRKVL KEVRAQDENN VCFECGAFNP QWVSVTYGIW ICLECSGRHR  
 GLGVHLSFVR SVTMDKWKDI ELEKMKAGGN AKFREFLEAQ DDYEPSWSLQ  
 DKYSSRAAAL FRDKVATLAE GKEWSLESSP AQNWTPPQPK TLQFTAHRPA  
 GQPQNVTTSG DKAFEDWLND DLGSYQGAQE NRYVGFNTV PPQKREDDFL  
 NSAMSSLYSG WSSFTTGASK FASAAKEGAT KFGSQASQKA SELGHSLNEN  
 VLKPAQEKVK EGR IFDDVSS GVSQ~~LASKVQ~~ GVGSKGWRDV TTF~~FS~~GKAED  
 TSDRPLEGHS YQNSSGDNSQ NSTIDQSFWE TFGSAEPPKA KSPSSDSWTC  
 ADASTGRRSS DSWDIWGSGS ASNNKNSNSD GWESWEGASG EGRAKATKKA  
 APSTAADEGW DNQNW

B



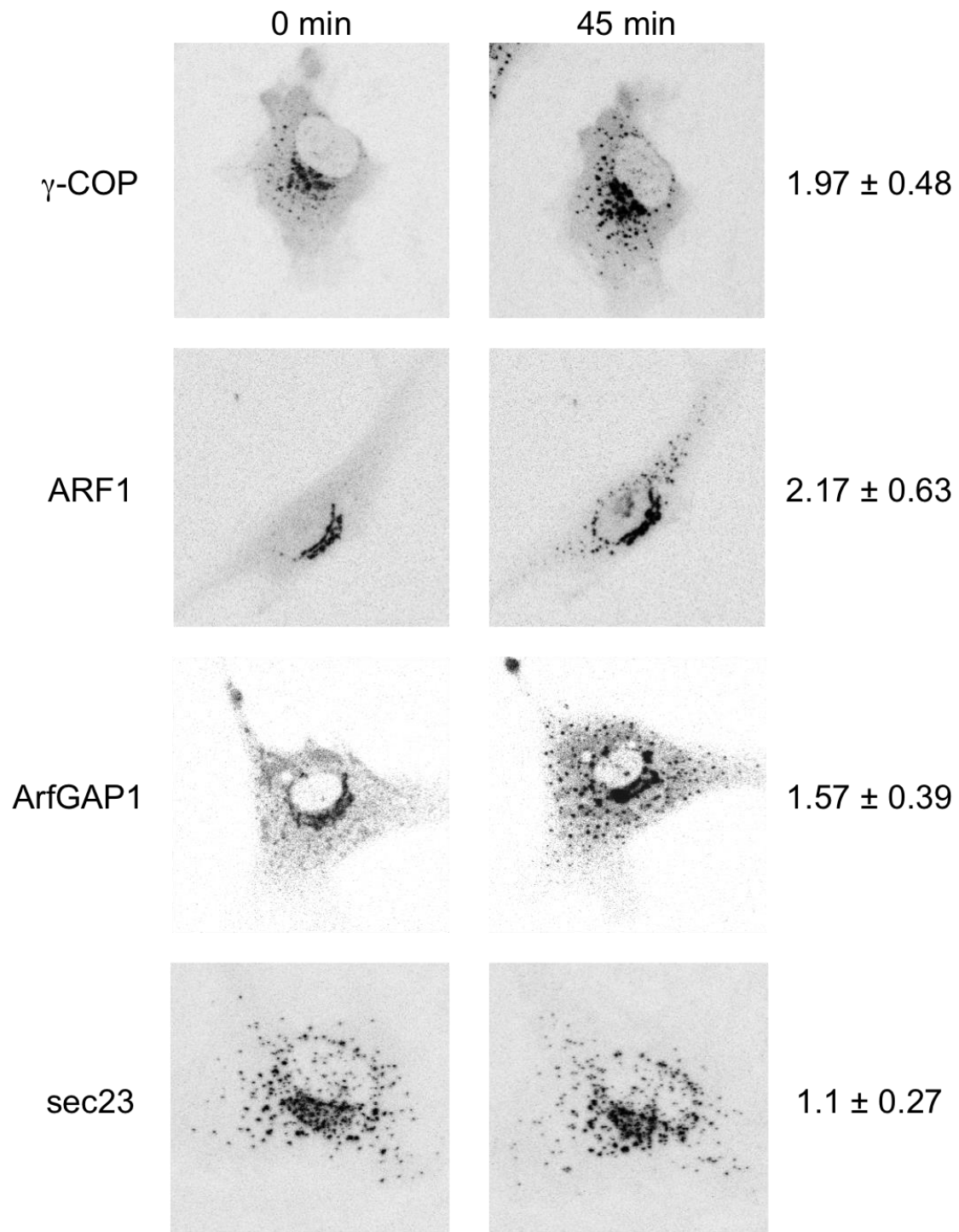
**Figura 11. Valoración de la capacidad de los dominios ALPS para mediar la asociación de ArfGAP1 a membranas intracelulares. (A)** En azul se indican las sustituciones por alanina llevadas a cabo en la secuencia primaria de aminoácidos de ArfGAP1 humana a fin de alterar la configuración de los dominios: ALPSI (residuos 198-234) y ALPSII

(residuos 263-295). **(B)** Células transfectadas expresando la forma silvestre (WT) de ArfGAP1, así como aquella con el primer dominio (ALPSI) o bien el segundo (ALPS II) mutado, fueron incubadas a 15°C durante 3 horas, fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra ERGIC53. Barra: 10µm.

---

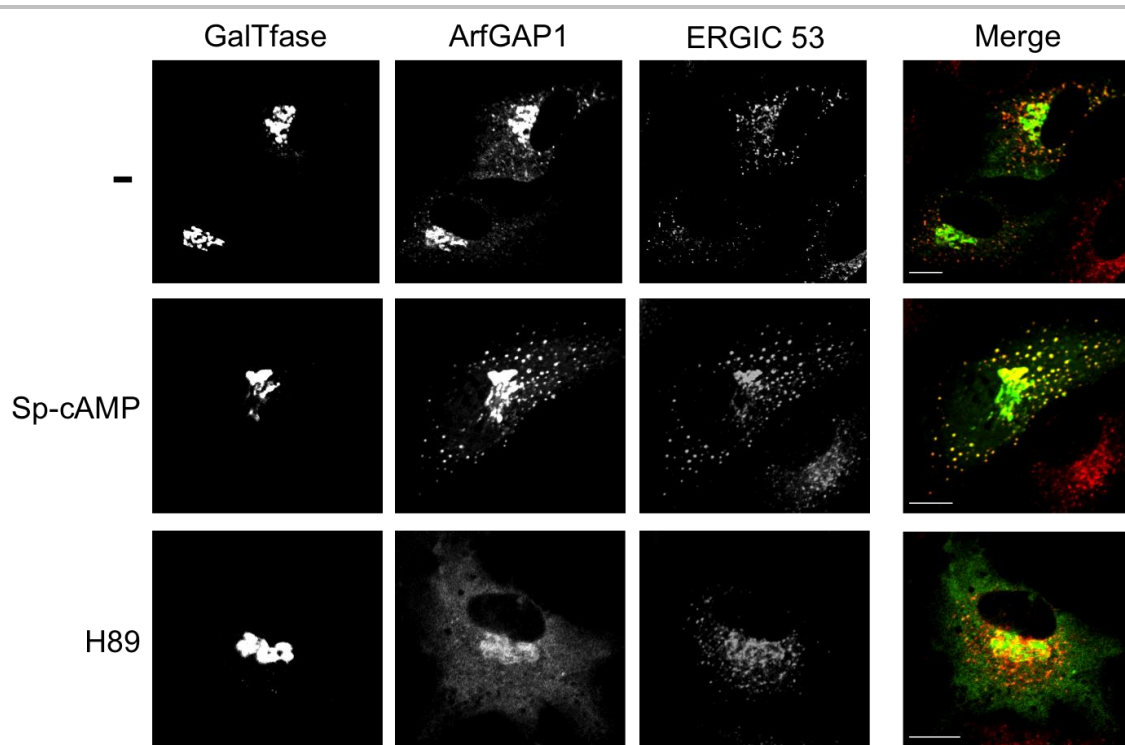
### **Efecto de la Vía del AMPc sobre el Reclutamiento de ArfGAP1**

Los resultados anteriores indican que los dominios ALPS son necesarios para el reclutamiento de ArfGAP1 desde el citosol a las membranas. Ahora bien, es evidente que no son suficientes, pues de otro modo no existiría una considerable cantidad de moléculas citosólicas. Sin duda, uno de los factores determinantes es la presencia de moléculas cargo. Diferentes laboratorios incluido el nuestro han demostrado con anterioridad la interacción de ArfGAP1 con los tallos citosólicos de varias proteínas integrales de membrana como el receptor de la secuencia KDEL (Aoe *et al*, 1997; Aoe *et al*, 1998; Cabrera *et al*, 2003). Otro posible factor a considerar sería la estimulación celular con señales extracelulares. Puesto que las células RPE1 poseen receptores  $\beta$ -adrenérgicos analizamos los efectos derivados de la estimulación con el agonista isoproterenol. En una primera aproximación, utilizamos células que expresaban formas fluorescentes de algunas proteínas implicadas en la formación de vesículas de transporte. Con tales células llevamos a cabo un experimento *in vivo* de captación de imágenes a intervalos fijos de tiempo tras la exposición a isoproterenol. La cantidad de componentes de la cubierta COPI como Arf1 o la subunidad  $\gamma$ -COP del coatómero asociada a membranas se incrementó progresivamente hasta duplicarse al cabo de 45 min-1 hora (Fig. 12). En ese tiempo también aumentó la asociación de ArfGAP1, pero en menor medida (1,6 veces). En cambio, el reclutamiento de sec23, un componente de la cubierta COPII, no experimentó incremento significativo tras la exposición a isoproterenol (Fig. 10). Estos resultados sugieren que la maquinaria responsable de la producción de vesículas COPI, incluyendo ArfGAP1, esta sometida a regulación por vías de señalización desencadenadas a partir de la activación de receptores situados en la membrana plasmática.



**Figura 12. Efecto de la estimulación celular con isoproterenol sobre el reclutamiento de proteínas de cubierta y sus reguladores.** Células expresando establemente formas fluorescentes de las proteínas indicadas fueron incubadas con  $10 \mu\text{M}$  de isoproterenol en medio mínimo. Las imágenes fueron tomadas justo antes (0 min) y 45 min después del tratamiento con isoproterenol. Para cada proteína, se indica el incremento (media  $\pm$  sem de tres observaciones) detectado durante el experimento en la asociación a membranas intracelulares.

Lo más probable es que la activación celular con isoproterenol curse con la participación de AMPc y PKA. Para comprobarlo, estudiamos los efectos derivados de la incubación con agentes moduladores de esta vía sobre la distribución intracelular de ArfGAP1-YFP. Así, la exposición a Sp-cAMP, un análogo permeable y no hidrolizable de este segundo mensajero, favoreció el reclutamiento de ArfGAP1 desde el citosol a elementos del ERGIC (Fig. 13). Por el contrario, la incubación con H89, un inhibidor específico de la actividad PKA, ocasionó la disociación de ArfGAP1 del compartimento ERGIC, en tanto que la proteína permaneció asociada a las membranas del complejo de Golgi (Fig.13). En suma, el ciclo de asociación/disociación llevado a cabo por ArfGAP1 a nivel de las membranas del compartimento ERGIC parece estar bajo la influencia de la vía de señalización del AMPc.

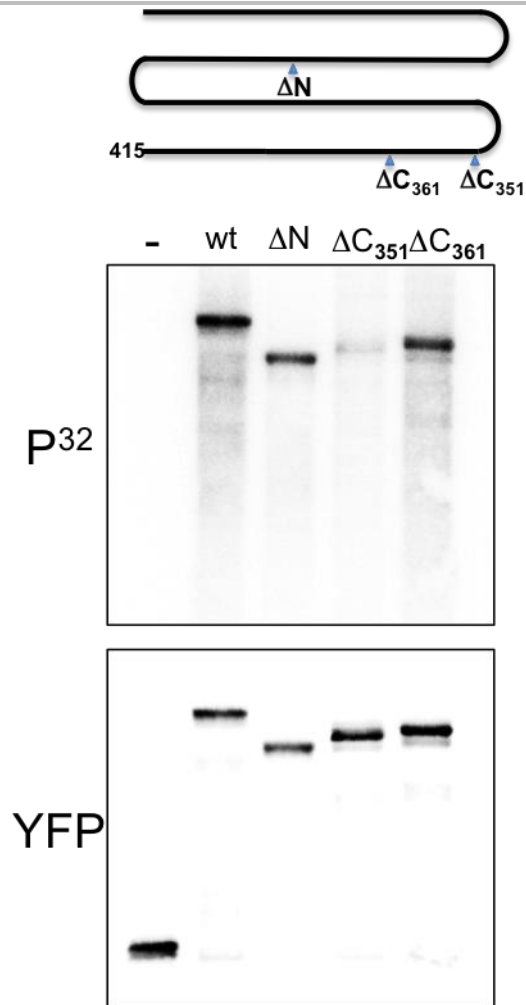


**Figura 13. Efecto del tratamiento con agentes moduladores de la actividad PKA sobre la asociación de ArfGAP1 a membranas intracelulares.** Células expresando conjuntamente las construcciones Galactosiltransferasa-CFP y ArfGAP1-YFP fueron incubadas durante 1 hora a 37°C en medio mínimo conteniendo 100  $\mu$ M de Sp-Br-AMPc o bien 30  $\mu$ M de H89. Posteriormente fueron fijadas y procesadas para inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo contra ERGIC53. Células control (-) no incubadas con los anteriores agentes fueron igualmente procesadas. Barra: 10  $\mu$ m.

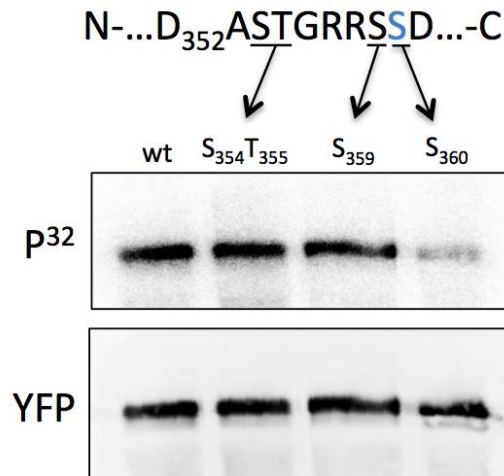


## FOSFORILACIÓN POR PKA

Con anterioridad se ha descrito que ArfGAP1 es objeto de fosforilación por la caseína quinasa (Yu & Roth, 2002), así como por la quinasa LRRK2 (Stafa *et al*, 2012; Xiong *et al*, 2012), si bien se desconoce la relevancia de estas modificaciones para la actividad funcional de la proteína. Puesto que teníamos evidencias de que la asociación de ArfGAP1 al compartimento denominado ERGIC podría estar regulada por la ruta del AMPc, investigamos la posibilidad de que durante la misma la proteína fuese fosforilada. Examinamos, en primer lugar, el estado basal de fosforilación en células no estimuladas, expresando ArfGAP1-YFP y marcadas metabólicamente con ortofosfato radioactivo. Tras la lisis celular, la proteína fue purificada mediante inmunoprecipitación, resuelta en gel y su radioactividad analizada mediante autorradiografía. En la Fig. 14, línea 2, puede comprobarse que la proteína silvestre (wt) incorporó fosfato radioactivo, pero no así el marcador YFP. Asimismo, evaluamos la fosforilación de diferentes formas truncadas. Todas ellas incorporaron fosfato radioactivo a un nivel comparable a la forma silvestre, a excepción de aquella que carecía de los últimos 64 aminoácidos que apenas fue fosforilada. Como quiera que la eliminación de 54 aminoácidos C-terminales no impidió la fosforilación (Fig. 14), nos centramos en la región de 10 aminoácidos comprendida entre ambas deleciones. Así pues, llevamos a cabo sustituciones puntuales por alanina de los residuos de serina o treonina presentes en esa zona y potencialmente fosforilables. Determinamos, de este modo, que el residuo de serina situado en posición 360 era responsable de la fosforilación detectada (Fig. 15).

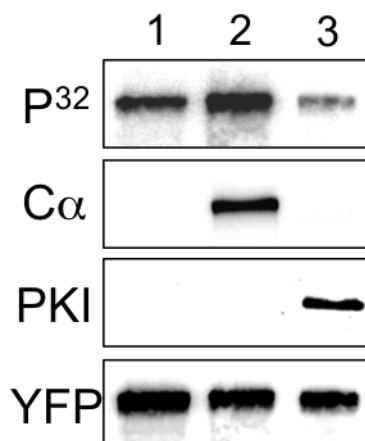


**Figura 14. Análisis de la fosforilación *in situ* de ArfGAP1.** Células expresando diferentes formas moleculares de la construcción ArfGAP1-YFP fueron usadas incluyendo la forma silvestre (wt), las variantes truncadas indicadas en el esquema y el vector YFP sin inserto (-). Las células fueron marcadas *in vivo* con ortofosfato radioactivo, lisadas y las proteínas inmunoprecipitadas a partir del extracto. Estas proteínas fueron resueltas mediante SDS-PAGE, transferidas a nitrocelulosa y visualizadas directamente mediante autorradiografía ( $P^{32}$ ), así como inmunoblot con un anticuerpo contra YFP.

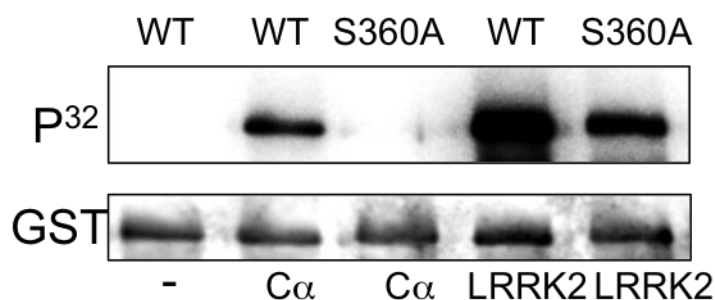


**Figura 15. Caracterización de serina 360 como lugar de fosforilación de ArfGAP1.** Células expresando la forma silvestre (wt) de la construcción ArfGAP1-YFP o bien sustituciones por alanina de los aminoácidos indicados fueron procesadas según el procedimiento expuesto en la Fig. 14.

El contexto (RRSS<sub>360</sub>) en el que se localiza el aminoácido fosforilado se corresponde con una secuencia consenso de fosforilación por PKA. A fin de comprobar la participación de esta quinasa, llevamos a cabo el marcaje metabólico de células cotransfectadas que, además de sintetizar la forma silvestre de ArfGAP1-YFP, expresaban o bien la subunidad catalítica C $\alpha$  de PKA o su inhibidor natural y específico PKI. En el primer caso, esto es en presencia de C $\alpha$ , hubo un incremento moderado en la cantidad de proteína fosforilada en comparación con las células que sólo expresaban ArfGAP1-YFP (Fig. 16). No obstante, lo más relevante fue la inhibición de la fosforilación de ArfGAP1 en presencia de PKI (Fig. 16). Para confirmar estos resultados, realizamos un ensayo de fosforilación *in vitro* con proteínas recombinantes puras y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Fig. 17). La forma silvestre de ArfGAP1 fue fosforilada tanto por la subunidad C $\alpha$  de PKA como por la quinasa LRRK2. Por el contrario, la forma mutante conteniendo la sustitución S<sub>360</sub>A solo fue fosforilada por LRRK2 (Fig. 17). Por tanto, ArfGAP1 es sustrato de la actividad PKA que la fosforila exclusivamente a nivel de la S<sub>360</sub>. La mutación de este residuo impide la actuación de PKA, pero no afecta a las fosforilaciones catalizadas por otras quinasas en otros lugares de la proteína.



**Figura 16. Efecto de los moduladores de la actividad PKA sobre la fosforilación del residuo serina 360 de ArfGAP1.** Células expresando la forma silvestre de ArfGAP1-YFP fueron o no (1) transfectadas adicionalmente con plásmidos que codifican para la subunidad catalítica C $\alpha$  de PKA (2) o bien el inhibidor natural de esta enzima, PKI (3). La proteína fue purificada mediante inmunoprecipitación a partir del lisado celular, resuelta mediante SDS-PAGE y transferida a nitrocelulosa. Las membranas fueron reveladas mediante autorradiografía (P<sup>32</sup>), así como inmunoblot secuencial con los anticuerpos específicos indicados.



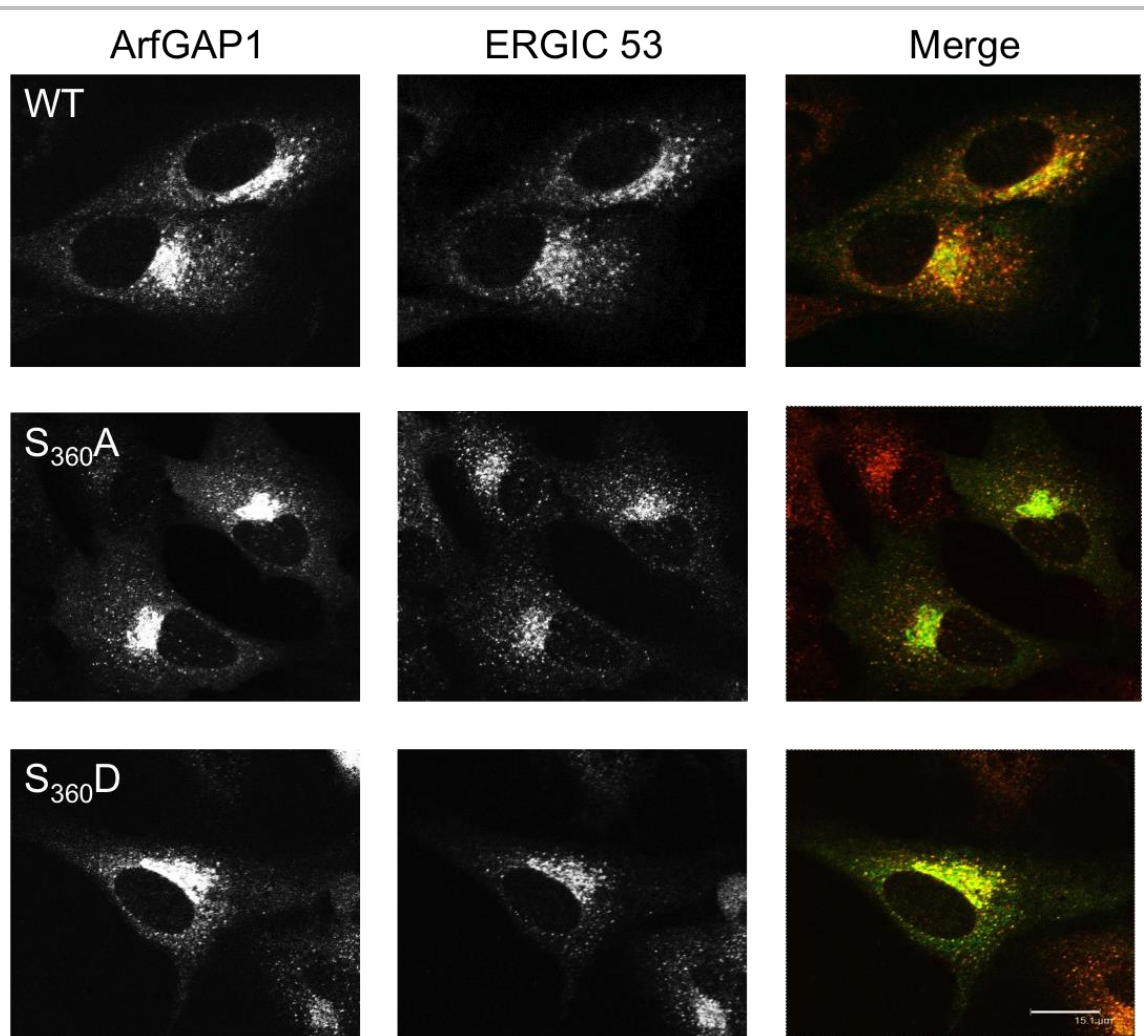
**Figura 17. Fosforilación *in vitro* de ArfGAP1.** Proteínas recombinantes purificadas a partir de lisados de bacterias productoras fueron incubadas con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, en presencia de la subunidad catalítica C $\alpha$  de PKA o bien de la proteína LRRK2 pura, así como en ausencia de cualquiera de ellas (-). Tras la incubación a 37°C durante 30 min, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis, transferida a nitrocelulosa y revelada mediante autorradiografía (P<sup>32</sup>) e inmunoblot (GST). Las proteínas analizadas fueron: la forma silvestre (WT) de ArfGAP1 y la variante mutada conteniendo alanina en sustitución de la serina 360 (S360A), ambas fusionadas a GST.

## Caracterización Funcional de la Fosforilación de la Serina 360

Con el fin de analizar la significación funcional de la fosforilación catalizada por PKA a nivel de S<sub>360</sub>, sustituimos este aminoácido por alanina o bien por ácido

áspartico. En el primer caso, S<sub>360</sub>A, se trataría de una proteína incapaz de ser fosforilada, en tanto que en el segundo, S<sub>360</sub>D, simularía un estado permanentemente fosforilado. Para la expresión de estas construcciones utilizamos células previamente silenciadas de ArfGAP1 endógeno, de forma que los efectos observados se debiesen únicamente a las mutaciones sometidas a evaluación.

En primer lugar, el modelo de distribución intracelular de ambas formas mutadas fue similar a la de la proteína silvestre. En los tres casos, las proteínas aparecieron concentradas en el complejo de Golgi y elementos del compartimento ERGIC, además de encontrarse dispersas por el citosol (Fig. 18).

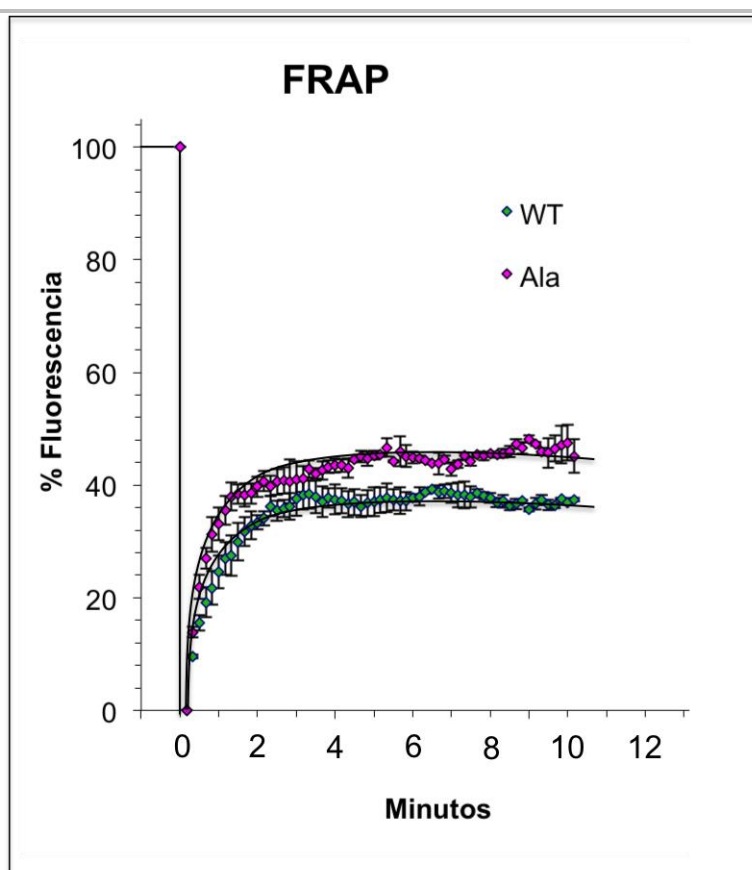


**Figura 18. Efecto de la mutación del residuo de serina 360 sobre la distribución intracelular de ArfGAP1.** Las células RPE1 fueron transfectadas con plásmidos que codifican la forma silvestre de ArfGAP1-YFP (WT) o bien las variantes puntualmente

mutadas resultantes de sustituir la serina 360 por alanina (S360A) o ácido aspártico (S360D). Tras la fijación, las células fueron procesadas para inmunofluorescencia indirecta con anticuerpo contra ERGIC53. Barra: 15,1  $\mu\text{m}$ .

---

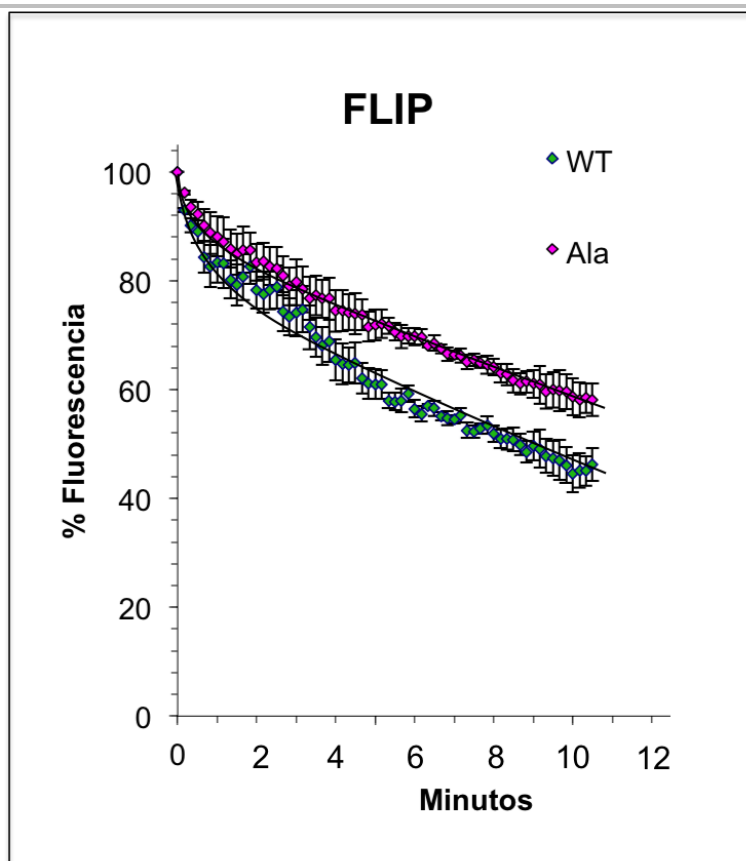
A pesar de estos resultados, pensamos que quizás las mutaciones introducidas pudieran alterar la dinámica de asociación y disociación a las membranas. Por tal motivo, utilizamos el procedimiento conocido como FRAP (descrito en Métodos) para comparar la cinética de unión a Golgi de las formas silvestre y la mutada S<sub>360</sub>A. En general, no apreciamos diferencias significativas entre ambas construcciones, siendo el  $t_{1/2}$  de asociación de 0,45 min en la forma silvestre (WT) y de 0,40 min en la forma mutada (Ala) (Fig. 19).



**Figura 19. Efecto de la mutación S360A sobre la cinética de asociación a Golgi de ArfGAP1.** La técnica conocida como FRAP (descrita en Métodos) fue aplicada a células expresando establemente la forma silvestre (WT) o bien la variante resultante de sustituir la serina en posición 360 por alanina (S360A). Los valores representados (media  $\pm$  sem) son media de mediciones realizadas en tres células independientes.

---

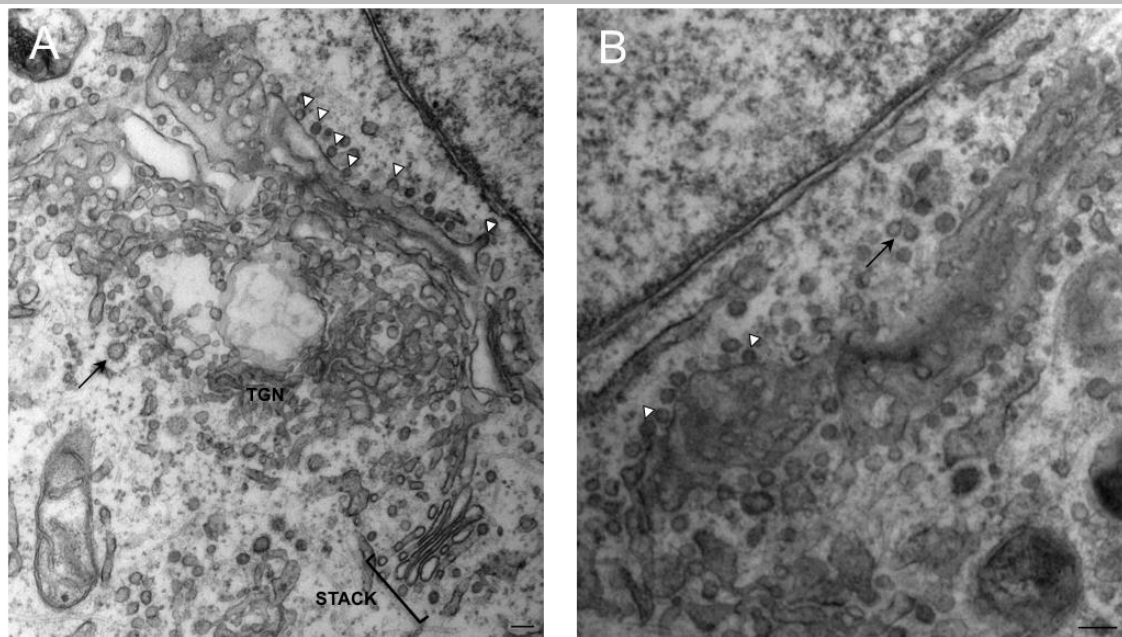
Asimismo, analizamos la cinética de disociación de las membranas del complejo de Golgi mediante la técnica conocida como FLIP y, de nuevo, no encontramos diferencias significativas entre ambas formas moleculares (Fig. 20). En este caso, el  $t_{1/2}$  de disociación fue de 3,16 min en la forma silvestre (WT) y de 3,48 min en la forma mutada (Ala).



**Figura 20. Efecto de la mutación S360A sobre la cinética de disociación de ArfGAP1 desde el complejo de Golgi.** La técnica conocida como FLIP (descrita en Métodos) fue aplicada a células establemente expresando la forma silvestre (WT) o bien la variante resultante de sustituir la serina en posición 360 por alanina (S360A). Los valores representados (media  $\pm$  sem) son media de mediciones realizadas en tres células independientes.

Los resultados anteriores nos indicaron que la fosforilación de ArfGAP1 por PKA no afecta a la interacción de la proteína con las membranas intracelulares. En principio, tampoco era de esperar que afectase a la actividad catalítica, puesto que el dominio responsable y el residuo fosforilado se encuentran en extremos

opuestos. No obstante, el examen al microscopio electrónico de transmisión de células que expresaban de forma estable la forma mutada  $S_{360A}$  pareció sugerir cierta afectación de las actividades de transporte. En particular, observamos que el complejo de Golgi de estas células se encontraba alterado (Fig. 21A). Así, las pilas cisternales eran más pequeñas de lo habitual y presentaban un menor número de cisternas. En cambio, la región del TGN aparecía amplificada. Numerosos procesos tubulares ramificados surgían del lado trans y se extendían hacia el citoplasma vecino. Lo más destacable, sin embargo, fue la modificación del lado cis (Fig. 21A). Las cisternas de esta parte se encontraban dilatadas y rodeadas de pequeñas (50-60 nm) vesículas cubiertas. Con frecuencia las vesículas aparecían unidas a la membrana cisternal (Fig. 21B) sugiriendo una inhibición en su proceso de formación o fusión.

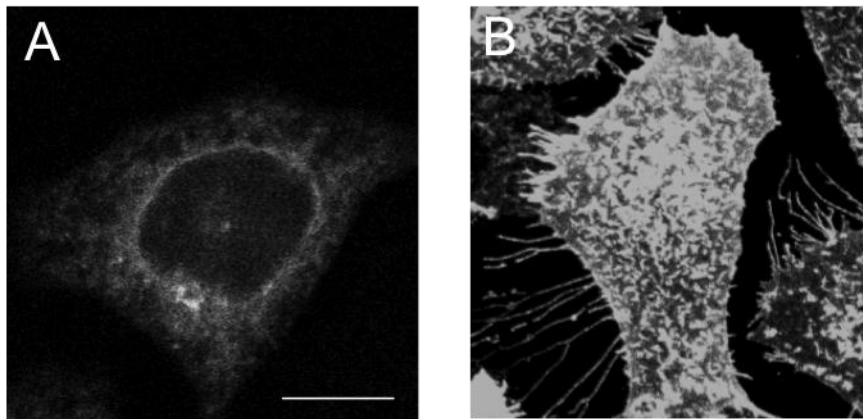


**Figura 21. Efecto de la mutación  $S_{360A}$  sobre la organización ultraestructural del complejo de Golgi.** Se utilizaron células que expresaban establemente la forma mutada resultante de sustituir por alanina el residuo de serina ubicado en posición 360 en la proteína nativa. Las células fueron fijadas y procesadas para microscopía electrónica de transmisión. Las flechas indican la presencia de perfiles vesiculares asociados a las cisternas. Barras: 100 nm.

---



Para examinar la posibilidad de que el transporte intracelular de proteínas dependiese de la fosforilación del residuo S<sub>360</sub>, llevamos a cabo varios experimentos morfológicos en el que comparamos la transferencia de moléculas cargo en células que expresaban la forma silvestre o bien alguna de las formas mutadas, bien fuera S<sub>360</sub>A o la variante S<sub>360</sub>D. Asimismo, examinamos células silenciadas que no expresaban ArfGAP1. En primer lugar, analizamos el transporte de la proteína vírica VSV-G a lo largo de la ruta exocítica. Tanto las células que expresaban alguna de las formas moleculares de ArfGAP1 como aquellas que habían sido silenciadas transportaron eficientemente esta proteína integral de membrana desde el RE hasta la membrana plasmática. Los resultados mostrados en la Fig. 22 se corresponden con células silenciadas.

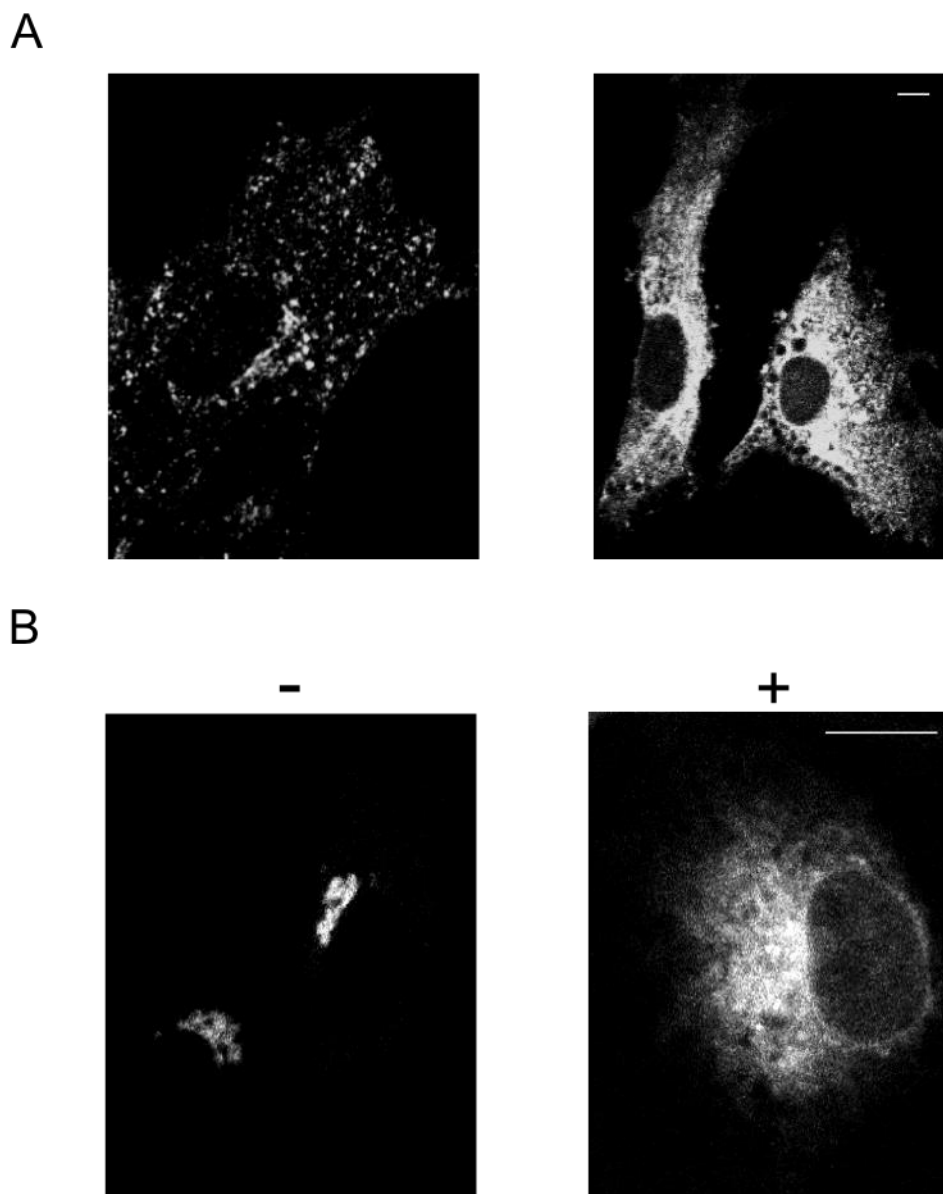


**Figura 22. Transporte intracelular de VSV-G en células carentes de ArfGAP1.** Las células RPE1 fueron incubadas con siRNAs específicos para ArfGAP1, tal y como se describe en la Fig. 4. Posteriormente fueron infectadas a 32°C con el mutante termosensible ts045 del virus de la estomatitis vesicular (VSV-ts045). **(A)** La proteína G de la envuelta del virus apareció acumulada en el RE tras la incubación de las células infectadas a temperatura restrictiva (40°) durante 4 horas. **(B)** Después de transferir las células a temperatura permisiva (32°C) y tras 1 hora de incubación a este temperatura, la proteína G logró abandonar el RE y alcanzó la membrana plasmática. Para la detección de VSV-G mediante inmunofluorescencia indirecta se utilizó o bien un anticuerpo contra el tallo citosólico de la proteína **(A)** o, alternativamente, uno dirigido contra su ectodominio **(B)**. Bar: 10 µm.

De forma similar, evaluamos el transporte retrógrado desde el complejo de Golgi al RE en sus dos modalidades, dependiente e independiente de COPI (Storrie *et al*, 2000). En el primer caso, incubamos las células con una forma recombinante y fluorescente de la toxina de Shiga para que fuese captada mediante endocitosis.

La presencia en el extremo C-terminal de la secuencia de recuperación KDEL, debería hacer posible el transporte de esta proteína desde endosomas hasta el RE a través del Golgi (Fig. 23A).

---



**Figura 23. Transporte retrógrado Golgi-RE en células carentes de ArfGAP1.** Las células RPE1 fueron silenciadas de ArfGAP1 tal y como se describe en las Figs. 6-7. **(A)** Las células fueron incubadas a 4°C con toxina de Shiga recombinante, pura, químicamente unida a rodamina. Tras su adsorción a la superficie celular, la toxina fue endocitada, detectándose retenida en endosomas tras la incubación durante 2 horas a 20°C. La incubación posterior a 37°C permitió su transferencia al RE. **(B)** Las células silenciadas de ArfGAP1 fueron incubadas (+) o no (-) con 5  $\mu\text{g}/\text{m}$  de BFA en medio mínimo. Tras la fijación, fueron procesadas para inmunofluorescencia con un anticuerpo contra la enzima residente en Golgi galactosiltransferasa. Barras: 10  $\mu\text{m}$ .

---

Por otro lado, incubamos las células con BFA a fin de inducir la redistribución, independiente de COPI, de enzimas del Golgi (Fig. 23B). En ambos casos, las proteínas viajaron hasta alcanzar su destino final: el retículo endoplásmico. Es más, no apreciamos diferencias entre los tipos celulares analizados. De nuevo, en la Fig. 23 mostramos células silenciadas, pero obtuvimos resultados similares con células que expresaban la forma silvestre de ArfGAP1 así como las formas mutadas, S<sub>360</sub>A o S<sub>360</sub>D.

Estos resultados pusieron de manifiesto que, de estar relacionada con algún tipo de actividad de transporte como pudiera ser la formación o fusión de vesículas, la fosforilación de la S<sub>360</sub> desempeñaría un papel modulador. En ningún caso constituiría un requerimiento, pues el transporte intracelular no experimenta inhibición en ausencia de tal modificación. Es más, a tenor de las observaciones realizadas, la propia proteína ArfGAP1 es un factor prescindible para el transporte entre compartimentos. Puesto que existen otras formas moleculares (ej. ArfGAP2/3) que podrían ejercer este papel y de hecho así ocurre en otros organismos (Spang *et al*, 2010), la cuestión que inevitablemente se nos planteó fue, ¿realmente cuál es la función principal de ArfGAP1? En la siguiente parte del estudio pretendemos responder a este interrogante.

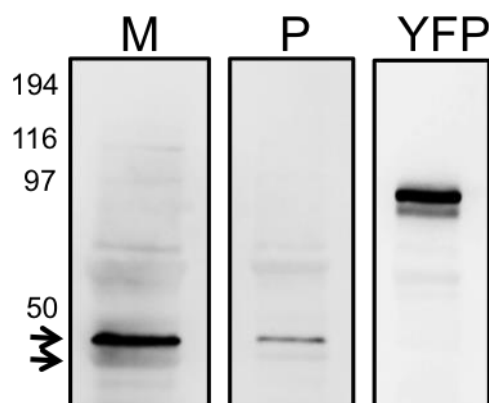
## **PRESENCIA DE ArfGAP1 EN EL NÚCLEO CELULAR**

### **Diversidad Molecular de ArfGAP1**

Paralelamente a los experimentos realizados sobre la participación de ArfGAP1 en el tráfico vesicular, observamos que, en extractos celulares totales, la proteína endógena presentaba dos formas moleculares ligeramente diferentes en tamaño (Fig. 24). Los resultados fueron similares independientemente del anticuerpo primario, monoclonal o policlonal, utilizado en la detección. Es más, la

proteína ectópica ArfGAP1-YFP también mostró un comportamiento similar, lo que nos hizo descartar la posibilidad de reconocimiento cruzado de alguna otra molécula por parte de los anticuerpos empleados (Fig. 24). En general, la forma molecular de menor tamaño constituyó una tercera parte ( $35\% \pm 0,769$ ) de la proteína total.

---



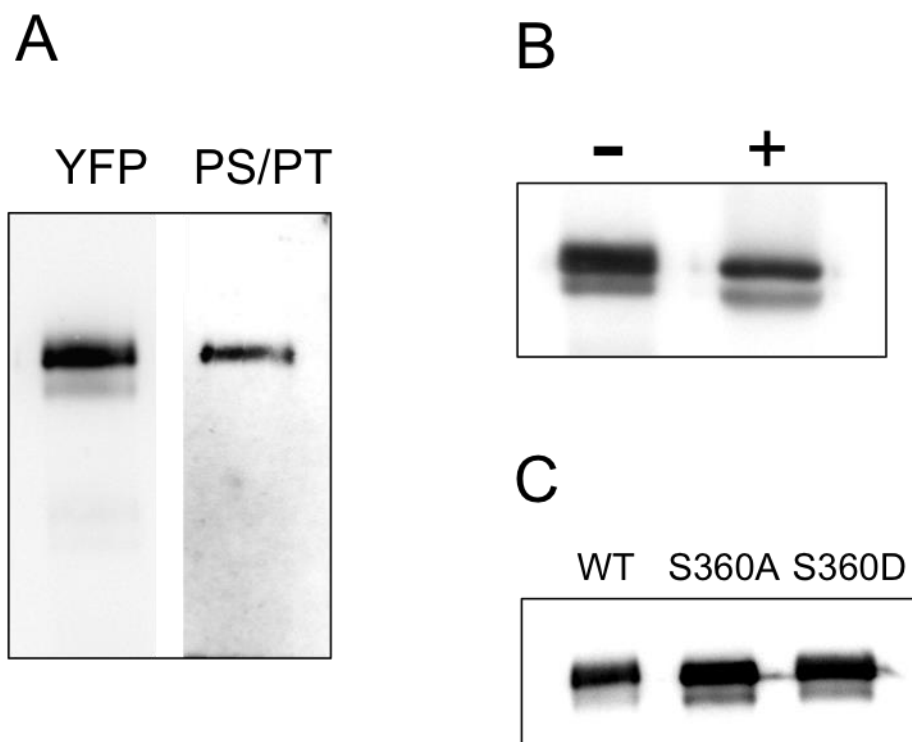
**Figura 24. Heterogeneidad molecular de ArfGAP1.** Células RPE1 no transfectadas o bien expresando ArfGAP1-YFP, fueron lisadas, y procesadas para SDS-PAGE e inmunoblot. Los anticuerpos utilizados fueron: policlonal anti-ArfGAP1 , monoclonal 1H6 anti-ArfGAP1 y policlonal anti-YFP. Los números indican el peso molecular de las bandas en kDa.

---

## Caracterización de las formas moleculares

Con el fin de caracterizar las diferencias existentes entre ambas formas moleculares de ArfGAP1, analizamos la posibilidad de que difiriesen en su grado de fosforilación. Por un lado, comprobamos que un anticuerpo comercial dirigido contra residuos fosforilados de serina y treonina reconoció la forma de mayor tamaño, pero no así la más pequeña (Fig. 25A). Este resultado concuerda con las observaciones realizadas previamente sobre incorporación de fosfato radioactivo *in vivo* (Figs. 14-16) e *in vitro* (Fig. 17). En ambos casos, solo detectamos una banda molecular como especie fosforilada. Así pues, diferencias en el grado de fosforilación podrían explicar la heterogeneidad observada dentro de la población de moléculas de ArfGAP1. Sin embargo, cuando llevamos a cabo la desfosforilación de las proteínas purificadas observamos disminución de tamaño en ambas formas

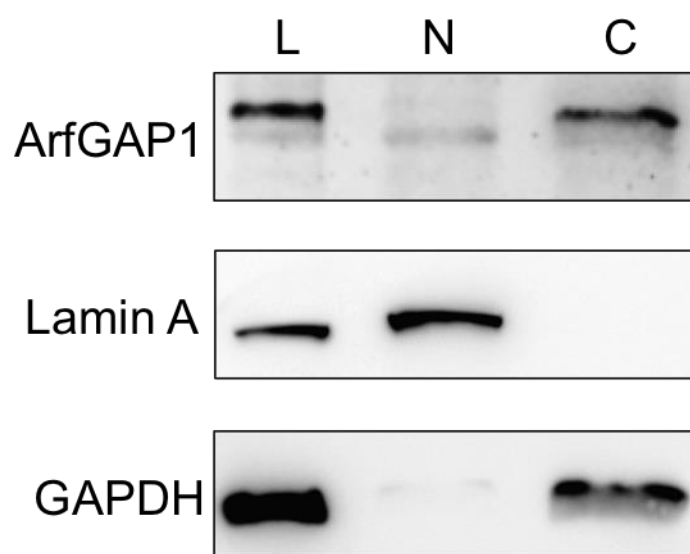
moleculares (Fig. 25B). Por tanto, la fosforilación no parece ser la única causa responsable de las diferencias de tamaño. En su lugar, es evidente que en condiciones steady-state ambas formas estarían fosforiladas, si bien la de mayor tamaño presentaría residuos fosforilados adicionales, reconocidos por el anticuerpo anti-fosfoserina/fosfotreonina, y que no estarían modificados en la forma molecular de menor tamaño. Entre tales residuos no se encontraría la serina 360, puesto que la formas mutadas S<sub>360</sub>A y S<sub>360</sub>D presentaron heterogeneidad en tamaño similar a la proteína silvestre (Fig. 25C).



**Figura 25. Diferencias en el grado de fosforilación entre formas moleculares de ArfGAP1.** (A) La proteína ArfGAP1-YFP fue purificada mediante inmunoprecipitación a partir de extracto total de células RPE1 expresando la construcción. La proteína fue resuelta mediante SDS-PAGE y detectada mediante inmunoblot con anticuerpo anti-fosfoserina/fosfotreonina (PS/PT). Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa fue despojada de anticuerpos (*stripping*) y revelada de nuevo con anticuerpo contra YFP. (B) La proteína eluida del inmunoprecipitado fue incubada (+) o no (-) con 10 unidades de fosfatasa alcalina durante 1h a 37°C con anterioridad a su procesamiento para SDS-PAGE e inmunoblot con anticuerpo anti-YFP. (C) La forma silvestre (wt) de ArfGAP1-YFP y las versiones mutadas S360A y S360D fueron inmunoprecipitadas a partir de extractos de células transfectadas con los correspondientes plásmidos. Las proteínas fueron resueltas en SDS-PAGE y detectadas mediante inmunoblot con anticuerpo anti-YFP.

## Presencia de ArfGAP1 en núcleo

A lo largo del presente estudio detectamos ocasionalmente la presencia de ArfGAP1, tanto la proteína endógena como ectópica, en el interior del núcleo celular. En principio, no consideramos que esta observación fuese relevante dada su inconsistencia y el hecho de que en la literatura no existiesen datos al respecto. Sin embargo, a raíz de la existencia de dos formas moleculares de distinto tamaño nos planteamos la cuestión de una posible segregación espacial entre ellas. Al llevar a cabo experimentos de subfraccionamiento celular como el mostrado en la Fig. 26, comprobamos que la forma molecular de menor tamaño se halla fundamentalmente localizada en el núcleo celular, en tanto que la mayor se encuentra concentrada principalmente en citoplasma. Por tanto, las diferencias en tamaño entre las formas moleculares de ArfGAP1 se corresponden con una distribución espacial diferencial de ambas.



**Figura 26. Detección de ArfGAP1 en el núcleo celular.** Células RPE1 no transfectadas fueron sometidas a subfraccionamiento celular tal y como se describe en Métodos a fin de separar la fracción nuclear (N) del citoplasma (C). Ambas fracciones, así como un extracto celular total (L), fueron procesadas para SDS-PAGE e inmunoblot con anticuerpo monoclonal 1H6 anti-ArfGAP1. La detección simultánea de lamin A y de la enzima Glicerilaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizada para evaluar la pureza de las fracciones nuclear y citoplásmica, respectivamente.

## **DISCUSIÓN**





## Localización

Como primera aproximación al estudio de la función de ArfGAP1, determinamos su localización subcelular. En las células analizadas, ArfGAP1 apareció concentrada a nivel del complejo de Golgi y del compartimento conocido como ERGIC. Este modelo de distribución concuerda con la idea general de que forma parte de la maquinaria molecular que sustenta los procesos de transporte intracelular mediados por vesículas. En concreto, la presencia de ArfGAP1 a nivel de ERGIC es de interés por cuanto constituye una estación preferente para el reconocimiento de componentes endógenos del RE y consiguiente devolución al mismo mediante transporte retrógrado. Es de destacar que, según nuestros datos, la adscripción a ERGIC constituiría una propiedad exclusiva de ArfGAP1. Incluso en condiciones de retención de moléculas cargo a baja temperatura (15°C), no hemos podido detectar la presencia en ERGIC de las formas ArfGAP2 y ArfGAP3. Por tanto, las relaciones de este compartimento con el resto de orgánulos celulares dependerían fundamentalmente de ArfGAP1.

Por otro lado, el reclutamiento desde citosol hacia estas localizaciones presenta requerimientos diferentes. Así, la asociación a ERGIC es independiente de la cubierta COPI, en tanto que, a juzgar por los efectos ocasionados por el tratamiento con BFA, la incorporación a Golgi vendría precedida por la asociación de los componentes de la maquinaria COPI. Asimismo, la unión a ERGIC requiere de dos dominios sensores del empaquetamiento lipídico denominados ALPS, mientras que solo uno de ellos es necesario para la asociación a Golgi. Sería deseable que en el futuro lográsemos determinar las condiciones que hacen posible la exposición de uno y otro dominio y su consiguiente inserción diferencial en membranas.

Golgi y ERGIC son las ubicaciones más destacables, pero ArfGAP1 se encuentra presente también en otras localizaciones. Así, recientemente se ha descrito su asociación dinámica a gotas lipídicas (Gannon *et al*, 2014). Por nuestra parte, hemos detectado la presencia de cantidades menores de ArfGAP1 en la superficie citosólica de la membrana plasmática y en el interior del núcleo celular. Esta última localización nos parece de interés, pues pensamos pone de manifiesto la participación de la proteína en procesos hasta ahora insospechados. Nuestros

resultados indican que habitualmente un tercio de la cantidad total de ArfGAP1 se encuentra presente en el interior del núcleo. Un porcentaje que, creemos, es relevante y cuya significación funcional esperamos determinar en un futuro próximo.

## **Papel en el transporte vesicular**

De las tres proteínas que en mamíferos participan en la inactivación de Arf1, ArfGAP1 es con mucho la mayoritaria, pues las otras dos (ArfGAP2 y ArfGAP3) apenas constituyen un tercio de la población total (Weimer *et al*, 2008). Se entiende pues que, desde su descubrimiento hace más de dos decenios, fuese objeto de atención preferente. De hecho, durante años ArfGAP1 fue considerado el factor responsable de desencadenar el desprendimiento de la cubierta COPI, tras la evaginación de la vesícula de transporte y como paso previo a su anclaje y fusión con el compartimento receptor (Donaldson, 2000). Sin embargo, esta visión fue cuestionada a partir del descubrimiento en levaduras de otra proteína, Glo3, con actividad catalítica similar (Poon *et al*, 1999). Precisamente los estudios en levadura revelaron que la proteína Glo3 es un requerimiento estricto para la formación de las vesículas COPI, siendo Gcs1 (el homólogo de ArfGAP1) un factor complementario, aunque no redundante (Lewis *et al*, 2004; Poon *et al*, 1999). Actualmente existe un amplio consenso en que Glo3 y sus ortólogos en mamíferos ArfGAP2 y ArfGAP3 son las moléculas implicadas en la génesis de las vesículas COPI (Kartberg *et al*, 2010). Ello no significa que la función de ArfGAP1 sea totalmente ajena al transporte vesicular mediado por COPI. Así, ArfGAP1 puede sustituir funcionalmente tanto a ArfGAP2 como a ArfGAP3 en ausencia de estas proteínas (Saitoh *et al*, 2009).

Por otro lado, el papel de ArfGAP1 como agente desactivador de Arf1 es también objeto de discusión. En concreto, en mamíferos se han obtenido evidencias que indican que ArfGAP1 podría promover la formación de las vesículas COPI, en lugar de inhibir su producción como hubiese sido de esperar según el modelo clásico (Shiba *et al*, 2011). De hecho, en el presente estudio hemos descrito que la sobreexpresión de ArfGAP1 induce la transformación de la cinta de Golgi en

grandes acúmulos de vesículas no cubiertas (Fig.5). Es probable entonces que, en lo referente al transporte vesicular, ArfGAP1 posea un papel dual. En una etapa temprana, podría favorecer la formación de vesículas mediante la captación de moléculas cargo, o bien induciendo la curvatura de la membrana gracias a sus dominios ALPS o incluso favoreciendo la asociación de la cubierta COPI. Sin embargo, una vez constituida la vesícula ejercería una acción fundamentalmente antagónica, promoviendo el desprendimiento de la cubierta a través de su acción inhibitoria sobre Arf1. Si así fuera, la actividad de ArfGAP1 debería estar sometida a regulación espacial y temporal, a fin de que tales efectos opuestos estuviesen eficazmente coordinados.

Sea como fuere la participación de ArfGAP1 en la formación de vesículas de transporte, no parece ser un factor imprescindible. Hemos comprobado que en las células silenciadas de esta proteína el transporte de moléculas cargo a través de las vías exocítica y endocítica continúa con eficiencia similar. La sustitución funcional de ArfGAP1 por ArfGAP2 y/o ArfGAP3 podría explicar este resultado. De hecho, en estudios previos se ha comprobado que la viabilidad celular solo se vio comprometida tras el silenciamiento simultáneo de las tres formas moleculares (Frigerio *et al*, 2007).

## Otras actividades funcionales

Recientemente se ha descrito la implicación de ArfGAP1 en procesos celulares que, en principio, no estarían relacionados con el tráfico vesicular. Uno de ellos, como se destacó en Introducción, es su influencia sobre el comportamiento dinámico de los filamentos de actina y la organización de esta red citoesquelética (Blader *et al*, 1999; Siu *et al*, 2011). Otras evidencias apuntan a la participación de Arf1 y sus moléculas reguladoras en vías de señalización como la denominada Wnt/ $\beta$ -catenina (Kim *et al*, 2013). En suma, es probable que las actividades funcionales de ArfGAP1 no estén restringidas a la formación de intermediarios de transporte, sino que se extiendan a otros aspectos de la fisiología celular. En este sentido, la presencia de ArfGAP1 en el núcleo interfásico abre el camino para investigar nuevas implicaciones funcionales de esta proteína.

## Regulación

La regulación de la actividad ArfGAP1 es otra aproximación que podría ayudar a dilucidar su papel funcional. En este sentido, hemos analizado la regulación dependiente de fosforilación. Con anterioridad se ha descrito que ArfGAP1 es objeto de fosforilación por caseína quinasa (Yu & Roth, 2002), así como por la quinasa denominada LRRK2 (Stafa *et al*, 2012; Xiong *et al*, 2012). En ninguno de estos casos se consiguió establecer la repercusión de estas modificaciones para la actividad funcional de la proteína. Por nuestra parte, hemos determinado que, en condiciones steady-state, ArfGAP1 es fosforilada a nivel de un residuo de serina situado en posición 360, esto es, muy próximo al extremo C-terminal. Esta región de la proteína es extensa y carece de motivos estructurales conocidos, si bien previsiblemente desempeñaría un papel relevante en la interacción con otras moléculas. De hecho, la serina 360 es un residuo conservado en todas las especies de vertebrados examinadas. Sin embargo, las mutaciones puntuales de este aminoácido no afectaron al destino de la proteína, su dinámica de asociación/disociación a membranas o al transporte intracelular de moléculas de carga. En definitiva, desconocemos el significado funcional de la fosforilación a nivel de serina 360. En cambio, hemos obtenido pruebas concluyentes de que la enzima encargada de catalizar esta modificación es la quinasa dependiente de AMPc o PKA. Así, la fosforilación de la serina 360 fue inhibida *in vivo* por el péptido denominado PKI, un inhibidor natural y específico de PKA (Fig. 16). Asimismo, la reacción *in vitro* catalizada por la subunidad C $\alpha$  de PKA fue abolida tras la sustitución por alanina de la serina 360 (Fig. 17).

## Diversidad Molecular

Más allá de las repercusiones funcionales que la fosforilación pudiera dar lugar, su existencia es causa de diversidad molecular. En las células de mamíferos estudiadas, pertenecientes a la línea celular RPE1, ArfGAP1 presenta dos formas moleculares ligeramente diferentes en tamaño. Ambas parecen estar fosforiladas, a tenor de los resultados obtenidos tras el tratamiento con fosfatasa alcalina (Fig. 25B), si bien un anticuerpo dirigido contra una secuencia peptídica

correspondiente a un posible “sustrato” de PKA solo reconoció la forma molecular de mayor tamaño (Fig. 25A). Dado que las proteínas mutadas conteniendo sustituciones por alanina o aspártico de la S360 presentan el mismo patrón de bandas para ArfGAP1 que la forma silvestre (Fig. 25C) no podemos concluir que la diferencia de tamaño existente entre las dos formas moleculares de ArfGAP1 se deba exclusivamente a la fosforilación del residuo de serina 360.

A nuestro parecer un hallazgo de suma importancia en el presente estudio ha sido poder establecer que las diferencias de tamaño entre las dos especies moleculares de ArfGAP1 se corresponden con una localización subcelular distinta (Fig. 26). La forma de tamaño superior, y que comparativamente se halla modificada en mayor grado, se localiza fundamentalmente en citoplasma y correspondería al pool de moléculas de ArfGAP1 estudiado hasta ahora. El resto comprende moléculas nucleares de menor tamaño, menos modificada post-traduccionalmente, y cuya función está aún por determinar.



# **CONCLUSIONES**





El estudio realizado sobre ArfGAP1 nos ha permitido alcanzar las siguientes conclusiones:

1. En condiciones normales, la mayor parte de esta proteína se encuentra asociada al complejo de Golgi y a elementos del compartimento intermedio ubicado entre el retículo endoplásmico y el Golgi. Estas estructuras son lugares de partida para el tráfico retrógrado destinado a recuperar componentes endógenos del retículo endoplásmico, por lo que la presencia de ArfGAP1 en las mismas pone de manifiesto la participación de la proteína en esta vía.
2. En el tráfico retrógrado Golgi-retículo, mediado por vesículas COPI, ArfGAP1 podría realizar un papel dual: por un lado, favoreciendo la formación de vesículas de transporte y, por otro, induciendo el desprendimiento de la cubierta. Así, su sobreexpresión dio lugar a la vesicularización de las cisternas del complejo de Golgi, al tiempo que promovió el desprendimiento de los componentes de la cubierta COPI al inducir la hidrólisis de GTP por parte de Arf1.
3. A pesar de ello, ArfGAP1 no es un factor imprescindible para el tráfico bidireccional retículo-Golgi. En su ausencia, el transporte de moléculas cargo continúa en ambos sentidos, posiblemente sustentado por las isoformas ArfGAP2 y ArfGAP3. Estas proteínas presentaron un modelo de distribución intracelular similar al de ArfGAP1, excepto que normalmente estuvieron ausente del compartimento intermedio retículo-Golgi.
4. Una parte significativa de las moléculas de ArfGAP1 se localiza en el interior del núcleo celular. Se trata de una variante molecular de menor tamaño, en comparación con la forma mayoritaria presente en citoplasma. Las diferencias entre ambas consistirían en un grado mayor de procesamiento post-traducciona l de la forma citoplásmica. Esta forma citoplasmática se encontraría

fosforilada diferencialmente con respecto a la de menor tamaño aunque esto no justifique la diferencia de peso entre ambas formas.

5. El estudio de la fosforilación de ArfGAP1 nos ha permitido identificar a un residuo de serina ubicado en posición 360 como lugar preferente de fosforilación. Se trata de un aminoácido altamente conservado en vertebrados, situado muy próximo al extremo C-terminal y, por ello, posiblemente implicado en interacciones moleculares. Los resultados indican que la fosforilación de este residuo esta catalizada por la quinasa dependiente de AMPc (PKA).

# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## REACTIVOS

### **Construcciones génicas**

Las construcciones génicas usadas para este trabajo fueron en su mayoría generadas en nuestro laboratorio ó bien cedidas por algún laboratorio externo. En la Tabla I se especifican cada una de ellas así como el diseño seguido para su elaboración.

Las estrategias seguidas para la obtención de dichas construcciones han sido clonación convencional, PCR simple y PCR doble (Tabla I). Esta última fue llevada a cabo según la técnica de reacción en cadena de la polimerasa por superposición y extensión (Ho *et al*, 1989). Consiste en hacer dos PCRs en las que cada una amplifica una parte del gen, es decir, desde el inicio hasta la zona a mutar inclusive y la otra desde la zona a mutar incluida hasta el final del gen. Los productos de sendas PCRs constituyen el molde para la PCR conjunta. El producto de esta reacción final es sometido a digestión, al igual que el vector receptor, con las enzimas de restricción adecuadas, antes de proceder a la ligación.

Todas las construcciones fueron amplificadas en bacterias de la estirpe DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* (*E.coli*) y purificadas a partir de las colonias seleccionadas. La purificación fue llevada a cabo mediante el kit de Maxiprep JETSTART 2.0 (Genomed). En todos los casos los ADNc utilizados fueron de una pureza entre 1,7-1,9.

Asimismo, todos los plásmidos utilizados en el presente estudio fueron verificados mediante secuenciación (Sistemas Genómicos).

Todos los oligonucleótidos usados en este estudio se emplearon como cebadores en reacciones de PCR. En la Tabla II, que se muestra a continuación, se presentan en sentido 5'-3' y, si fuera el caso, se destacan en negrita los nucleótidos mutados.

<b>Tabla I. Construcciones génicas</b>			
<b>Nombre (plásmido)</b>	<b>Origen</b>	<b>Estrategia</b>	<b>Oligonucleótidos</b>
ArfGAP1-YFP (pEYFP-N1)	J. Lippincontt-Schawartz (Liu <i>et al</i> , 2005)	-	-
ArfGAP1 S360A-YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	Doble PCR. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1a: YFPN1, ALA REV PCR1b: ALA DIR, GFP-STOP+EcoRV PCR2: YFPN1, GFP-STOP+EcoRV
ArfGAP1 S360D-YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	Doble PCR. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1a: YFPN1, ASP REV PCR1b: ASP DIR, GFP-STOP+EcoRV PCR2: YFPN1, GFP-STOP+EcoRV
$\Delta$ N ArfGAP1-YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	Doble PCR. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1a: YFPN1, RevGAP-sinN PCR1b: DirGAP-sinN, EGFPN PCR2: YFPN1, EGFPN
ArfGAP1 $\Delta$ ALPS I-YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	Doble PCR. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1a: YFPN1, ALPSrev PCR1b: ALPSdir, EGFPN PCR2: YFPN1, EGFPN
ArfGAP1 $\Delta$ ALPS II-YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	Doble PCR. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1a: YFPN1, ALPS2rev PCR1b: ALPS2dir, EGFPN PCR2: YFPN1, EGFPN
ArfGAP1 $\Delta$ C <sub>351</sub> -YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	PCR simple. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1: YFPN1, C351rev
ArfGAP1 $\Delta$ C <sub>361</sub> -YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	PCR simple. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1: YFPN1, C361rev
ArfGAP1 S354A, T355A-YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	Doble PCR. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1a: YFPN1, S/T354-5rev PCR1b: S/T354-5dir, GFP-STOP+EcoRV PCR2: YFPN1, EGFPN
ArfGAP1 S359A-YFP (pEYFP-N1)	Este estudio	Doble PCR. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1a: YFPN1, S359Arev PCR1b: S359Adir, GFP-STOP+EcoRV PCR2: YFPN1, EGFPN
GST-ArfGAP1 (pGEX-5X-2)	Este estudio	PCR simple. Molde: ArfGAP1-YFP	PCR1: full dir, full rev
GST-ArfGAP1 S360A (pGEX-5X-2)	Este estudio	Clonación convencional. Inserto: ArfGAP1 S360A-YFP	-

Nombre (plásmido)	Origen	Estrategia	Oligonucleótidos
ArfGAP2-GFP (pEGFP-C2)	D.Cassel (Kliouchnikov <i>et al</i> , 2009)	-	-
ArfGAP3-GFP (pEGFP-C2)	D.Cassel (Kliouchnikov <i>et al</i> , 2009)	-	-
PKI-GST (pEYFP-N1 sin YFP pero con GST)	Este estudio	Clonación convencional. Inserto: GST (pErd2-GST)	-
C $\alpha$ -GST (pEYFP-N1 sin YFP pero con GST)	Este estudio	Clonación convencional. Inserto: GST (pErd2-GST)	-
Galactosiltransferasa- CFP (pECFP-N1)	Este estudio	Clonación convencional. Inserto: pEYFP-Golgi	-
$\gamma$ -COP (pEYFP-N1)	Este estudio	Clonación convencional. Inserto: pECFP- $\gamma$ -COP	-
Sec23A (pEYFP-C1)	Este estudio	Clonación convencional. Inserto: pECFP-Sec23A	-
YFP (pEYFP-N1)	Comercial (Clontech)	-	-

Nombre	Secuencia 5'-3'
YFPN1	CAGAGCTGGTTTGTAGTGAACCGTCA
ALA REV	CCAAATGTCCCAGCTGTCCGCGCTCCTCCTTCCCGT
ALA DIR	ACGGGAAGGAGGAGCGCGGACAGCTGGGACATTTGG
GFP-STOP+EcoRV	TGATCTAGAGTCGCGGCCGCTGATATCGTACAG
ASP REV	CCAAATGTCCCAGCTGTCA <b>T</b> CGCTCCTCCTTCCCGT
ASP DIR	ACGGGAAGGAGGAGCG <b>A</b> TGACAGCTGGGACATTTGG
RevGAP-sinN	TCGGTGGGCAGTGA <b>A</b> CTGCAGCGTCA <b>T</b> GGGCTGAGGTGGGGT <b>C</b> GAATTCTGGGCA GGCGATGA
DirGAP-sinN	TCATCGCCTGCC <b>A</b> GAAT <b>T</b> TCGACCC <b>C</b> ACCTCAGCC <b>A</b> TGACGCTGCAG <b>T</b> TCACTGC CCACCGA

<b>Tabla II. Oligonucleótidos. Continuación</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>
EGFPN	GTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
ALPSrev	CGCAAACCTTGCTCGCCCCAGTGGTAGCACTGCTCGCGCCGAGTACGCAGATGAT <b>GCGGCGCTGTTGAGGAAGTCATC</b>
ALPSdir	GATGACTTCCTCAACAGCGCCGCATCATCTGCGTACTCGGGCGCGAGCAGTGCTA CCACTGGGGCGAGCAAGTTTGCG
ALPS2rev	AGTGTCTTCAGCTTTCCCAGAAGCGGCGGTTCGTGGCATCACGCGCTCCCTTACTG CCAGCTCCCTGGGCCTTGATGCCAACTGAGAGACCCC
ALPS2dir	GGGGTCTCTCAGTTGGCATCCAAGGCCAGGGAGCTGGCAGTAAGGGAGCGCGTG ATGCCACGACCGCGCTTCTGGGAAAGCTGAAGACACT
C351rev	CCAGCTGTCCGAGCTCCTCCTCCCGTTGAGACCGGTGCGCAGGTCCAGCTGTCAC TGCTTGGGGACTT
C361rev	GGATGCAGAACCTGAGCCCCAAATGACCGGTCTGTCCGAGCTCCTCCTTCCCGTT GAGGC
S/T354-5rev	CGAGCTCCTCCTTCCCGCTGCGGCATCTGCGCAGGT
S/T354-5dir	ACCTGCGCAGATGCCGCAGCGGGAAGGAGGAGCTCG
S359Arev	GTCCCAGCTGTCCGAGGCCCTCCTTCCCGTTGAGGC
S359Adir	GCCTCAACGGGAAGGAGGGCCTCGGACAGCTGGGAC
full dir	ACCGTCAGATCCGCTAGCGCTCCCGGGCTCAGATCTCGAGCTCAAGCT
full rev	CTCCTCGCCCTTGCTCACCATGGCGGCCGCGGTCCACCAGTTCTGGTTGTCCCAGC C
<b>Negrita:</b> mutaciones introducidas.	

## Anticuerpos

Los anticuerpos usados en este trabajo tanto para inmunofluorescencia (IF) como para inmunoblot (WB) están recogidos en las Tablas III y IV que se muestran a continuación.

<b>Tabla III. Anticuerpos primarios</b>						
<b>Antígeno</b>	<b>Tipo</b>	<b>Especie</b>	<b>Uso</b>	<b>Fijación</b>	<b>Permeabilización</b>	<b>Procedencia</b>
YFP	Policlonal	conejo	WB	-	-	D Bioscience Clontech
PP PKA	Policlonal	conejo	WB	-	-	Cell Signalling Technologies
β' COP	Policlonal	conejo	WB	-	-	Dr. Wieland
GST	Policlonal	cabra	WB	-	-	Amershan Pharmacia Boitech
ArfGAP1	Policlonal	conejo	WB /IF	Pfm 4%	TX-100	Santa Cruz Biotechnologies
ArfGAP1 1H6	Monoclonal	ratón	WB	-	-	Origene Biotechnologies



Antígeno	Tipo	Especie	Uso	Fijación	Permeabilización	Procedencia
$\beta$ -COP	Monoclonal	ratón	IF	Pfm 4%	TX-100/SDS	Sigma
ERGIC 53	Monoclonal	ratón	IF	Metanol	TX-100	Enzo Life Sciences
Galactosil-transferasa	Monoclonal	ratón	IF	Metanol	PBS/BSA/Saponina	CellMab AB
P5D4 (dominio citosólico VSV-G)	Monoclonal	ratón	IF	Pfm 4%	PBS/BSA/Saponina	Sigma Aldrich
8G5F11 (ectodominio VSV-G)	Monoclonal	ratón	IF	Pfm 4%	No	De. Matteis
Lámina A	Monoclonal	ratón	WB	-	-	Abcam
GAPDH	Monoclonal	ratón	WB	-	-	Chemicon International

Antígeno	Tipo	Especie	Uso	Procedencia
IgG Conejo	Secundario+HRP	cabra	WB	Pierce
IgG Ratón	Secundario+HRP	cabra	WB	Pierce
IgG Cabra	Secundario+HRP	conejo	WB	Pierce
IgG Ratón	Secundario+A647	conejo	IF	Molecular Probes
IgG Conejo	Secundario+A488	cabra	IF	Molecular Probes

## Producción de proteínas recombinante marcadas con GST

Los ADNs utilizados para la obtención de proteínas recombinantes fueron GST-ArfGAP1 y GST-ArfGAP1 S360A. La estirpe de bacteria productora utilizada fue BL21 pRARE de *E.coli* la cual fue transformada por el método TSS (Chung *et al*, 1989) con cada uno de los ADNs por separado y con el plásmido control pGEX-5X-2. Tras seleccionar las colonias positivas y crecerlas a 37°C hasta densidad óptica 0,6-0,8, se indujo su producción con 1mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (Roche Diagnostic) durante 5 horas a 24°C.

La purificación de las proteínas se llevó a cabo en tampón TBS (20mM Tris-HCl pH7,4, 120mM NaCl) conteniendo 100 $\mu$ g/ml de lisozima de gallina (Fluka), 1mM de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)(Sigma) y 1mM de EDTA (ácido etildiaminotetraacético)(Sigma). Los cultivos fueron homogenizados en un sonicador (Sonifier 250, Branson) al 50% de constancia y a un nivel 2-3. Consistió en 3 ciclos de 1 minuto de duración cada uno con 30 segundos de reposo entre

ciclos. Inmediatamente después se añadió 0,5% de Tritón X-100 (Sigma) y, tras centrifugar a 14000 rpm durante 30 minutos, el sobrenadante fue incubado con Glutathión sefarosa (Amershan Biosciences) a 4°C durante 18-20 horas con agitación orbital. Las proteínas fueron separadas de la matriz con el tampón de elución (10mM glutathione reducido, 50mM Tris-HCl pH 8,0). Los eluidos fueron dializados en tripas de diálisis (Sigma) con tampón de diálisis (5mM Hepes pH 7,6, 1mM DTT, 0,2mM PMSF, 1mM EDTA y 10% de glicerol) durante 2 horas a 4°C cambiando el tampón cada 30 minutos. La concentración de proteínas se midió con el método Bradford.

### **Otros reactivos utilizados**

Los medios de cultivo celular, antibióticos, suero fetal bovino y glutamina fueron adquiridos de Gibco Life Technologies. Las enzimas de restricción y demás enzimas usadas en biología molecular fueron adquiridas de Roche Diagnostic, New England Biolabs ó Takara. De Sigma-Aldrich obtuvimos el ATP, GTP y DTT, además de los inhibidores de proteasas y fosfatasas.

## MÉTODOS

### **1. Procedimientos generales**

#### **Cultivo celular y tratamientos**

Durante todo el estudio se utilizó la línea celular RPE1 (Retinal pigment epithelium). Las células fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (1:1) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM de L-glutamina, 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina (medio completo, MC). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>/95% aire, recibiendo periódicamente (cada dos días) medio nuevo precalentado a 37°C. Para los experimentos de inmunofluorescencia indirecta se utilizaron cultivos adheridos a cubreobjetos de cristal cubiertos de poli-L-lisina (Roche Diagnostics) en condiciones de 70-80% de confluencia.

Los tratamientos fueron llevados a cabo en medio DMEM/F12(1:1) carente de suero, glutamina y antibióticos (medio mínimo, MM). Las drogas utilizadas y las concentraciones de trabajo se muestran a continuación en la Tabla V. En los casos en que fue necesario depletar de factores séricos, las células fueron lavadas con MM.

<b>Drogas</b>	<b>Concentración</b>
Isoproterenol (Sigma)	10 $\mu$ M
Brefeldin A (BFA) (Sigma)	5 $\mu$ g/mL
H89 (Calbiochem)	30 $\mu$ M
Sp-Br-cAMP (Biolog Life Science)	100 $\mu$ M

## **Baja Temperatura**

Para los experimentos a baja temperatura las células fueron incubadas en un baño a 15°C durante 3 horas en MC precalentado conteniendo 25 mM de Hepes (Gibco, Invitrogen). Posteriormente, las células fueron procesadas para estudios microscópicos.

## **Transfección**

Las células fueron sembradas el día anterior a una densidad tal que en el momento de la transfección hubieran alcanzado un 60-70% de confluencia. Como reactivo lipofílico se utilizó FuGENE 6 (Roche Diagnostic) siguiendo, para la transfección, las indicaciones del fabricante con diferentes modificaciones. En resumen, se mezclaron 96  $\mu$ l de medio OptiMEM (Gibco) con 4  $\mu$ l de FuGENE 6 procediendo a una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. A la mezcla anterior se añadieron 2  $\mu$ g de ADN plasmídico procediéndose a una incubación adicional de 30 minutos. La mezcla de transfección fue añadida gota a gota al cultivo previamente lavado con MM y conteniendo 900  $\mu$ l de este medio. Tras 4-5 horas de incubación a 37°C se adicionó 1 ml de MC. El tiempo de expresión de las diferentes proteínas fue óptimo a partir de 24-48 horas.

Para la obtención de transfectantes estables, los cultivos transfectados fueron suplementados con el antibiótico Geneticina G418 (Gibco) a una concentración de 1 mg/ml en MC.

### **Silenciamiento de ArfGAP1**

Las células fueron sembradas en placas de 35 mm de diámetro entre 24-48 horas previas al silenciamiento a una densidad tal para que alcanzaran el 40-50% de confluencia en el momento de la transfección. Se utilizó una mezcla de oligonucleótidos del tipo siRNA (small interfering RNA) diseñados especialmente para inhibir la expresión de ArfGAP1 humana (Smart pool) (Dharmacon). Como reactivo de silenciamiento se utilizó Dharmafect-1 (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante con diferentes modificaciones. En resumen, se mezclaron 197,5 µl de OptiMEM (Gibco) con 2,5 µl de Dharmafect-1 (mezcla I) y 190 µl de OptiMEM (Gibco) con 10 µl de siRNA 20 µM (Smart pool) (mezcla II) procediendo a una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente para esta última. A continuación se añadió la mezcla II sobre la mezcla I pipeteando suavemente, llevando a cabo una incubación adicional de 20-25 minutos. La mezcla de silenciamiento fue añadida gota a gota al cultivo previamente lavado con MM y conteniendo 400 µl de este medio. Pasadas 2-3 horas de incubación a 37°C se adicionó 1,2 ml de MC. El tiempo de silenciamiento para ArfGAP1 fue óptimo a partir de 48-72 horas.

### **Subfraccionamiento celular**

Para el subfraccionamiento celular, las células no transfectadas fueron sembradas y cultivadas en placa de 60 mm de diámetro hasta confluencia. Posteriormente se lavaron tres veces con tampón hipotónico frío (10 mM Tris-HCl, pH 7,9, 10 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>). A partir de este momento, todo el proceso se realizó a 4°C. Tras eliminar el tampón de lavado, la lisis tuvo lugar durante 2 minutos con 600 µl del mismo tampón hipotónico pero conteniendo 0,1% de Tritón X-100 (Sigma), 1 mM de DTT (Sigma) e inhibidores de proteasas y fosfatasas (para más detalle ver Tabla VI). Las células fueron separadas de la placa

con un rascador y pasadas a un tubo eppendorf donde se homogenizaron haciéndolas pasar varias veces, durante 2 minutos, por una aguja de 25G acoplada a una jeringa de insulina. Los núcleos celulares se obtuvieron por centrifugación a 3000xg durante 10 minutos a 4°C, siendo posteriormente lavados una vez con tampón hipotónico. A continuación el pellet de núcleos se procesó con 135 µl de sample buffer 2X (ver Tabla VI) y 15 µl de 200 mM de DTT (concentración final 20mM) a 96°C durante 15 minutos.

El citosol separado de los núcleos fue precipitado con 500 µl de Tricloroacético (TCA) 100% (Merck) durante 2-3 horas. Pasado ese tiempo se procedió a su centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El pellet de proteínas precipitadas se lavó 4 veces con acetona fría (4°C) centrifugando a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C en cada lavado. Después del último lavado se aspiró al máximo la acetona, secando las muestras completamente durante 1-3 minutos en un termobloque a 37°C. El pellet se procesó de la misma manera que los núcleos. Las fracciones nuclear y citosólica fueron analizadas mediante SDS-PAGE (descrito a continuación en *Electroforesis y "western blot"*).

## **Inmunoprecipitación**

Finalizados los correspondientes tratamientos, las células fueron lavadas un par de veces con PBS frío y lisadas con 900 µl de tampón RIPA frío, conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasas (Tabla VI). Los lisados fueron transferidos a tubos eppendorfs, agitados en "vortex" y mantenidos en hielo durante 5-10 minutos tras lo cual se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos para eliminar los núcleos. Llegados a este punto, cuando fue necesario detectar las formas moleculares de ArfGAP1, los lisados fueron sonicados tal y como se detalla en el apartado *Desfosforilación con Fosfatasa Alcalina*. En ambos casos, el sobrenadante fue transferido a tubos eppendorfs nuevos conteniendo 25 µl de matriz anti-GFP (GFP-Trap de Chromotek) la cual había sido previamente lavada con tampón de lisis. Tras proceder a una incubación de 2-18 horas a 4°C en un agitador orbital, los inmunoprecipitados se lavaron 5-6 veces con tampón RIPA y 3-4 veces con 10 mM de Tris-HCl pH 8,0. Una vez descartado todo el sobrenadante

los inmunoprecipitados fueron precesados con 15  $\mu$ l de sample buffer 2X y 3  $\mu$ l de 200 mM de DTT (10X), durante 15 minutos a 96°C.

### **Electroforesis y “western blot”.**

Las mezclas de proteínas desnaturalizadas fueron analizadas mediante electroforesis monodimensional a 4°C en geles de poliacrilamida que contenían SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). La concentración de acrilamida fue del 7-12% y la electroforesis fue realizada bajo condiciones de voltaje constante a 200V. Tras la resolución electroforética, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante transferencia húmeda, en tampón Towbin, aplicando un voltaje constante de 60V durante 1 hora a 4°C (Towbin *et al*, 1979).

### **Inmunoblot**

La membrana de nitrocelulosa conteniendo las proteínas transferidas fue bloqueada con TBS-Tween conteniendo leche en polvo y azida. Posteriormente fue incubada en el anticuerpo primario, diluido en el tampón de bloqueo, durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras 30 minutos de lavado en el mismo tampón pero carente de azida, se procedió a la incubación durante 1 hora con el anticuerpo secundario, diluido en el tampón de lavado. Finalmente, la membrana fue lavada con TBS-Tween durante 30 minutos y revelada con reactivos Femton (Pierce) en un dispositivo LAS3000mini (Fujifilm).

Cuando fue requerido hacer un inmunoblot distinto con otro anticuerpo sobre la misma membrana, se utilizó la técnica de “stripping”. Para ello, la membrana fue incubada durante 30 minutos exactos con el tampón de “stripping” y lavada posteriormente cada 10 minutos con PBS/0,1% Tween durante 30 minutos.

En el caso de que las proteínas trasferidas a las membranas de nitrocelulosa fueran radiactivas, se procedió en primer lugar a revelarlas en un dispositivo PhosphorImager Fujifilm FLA-5100.

Todos los tampones referidos en los apartados *Inmunoprecipitación*, *Electroforesis* y “*western blot*” e *Inmunoblot* aparecen descritos en la Tabla VI que se muestra a continuación.

<b>Tabla VI. Tampones usados en los apartados Inmunoprecipitación, Electroforesis y “western blot” e Inmunoblot.</b>	
<b>Tampón</b>	<b>Composición y concentración</b>
<b>PBS</b>	10 mM de Tampón fosfato pH 7,2-7,4 conteniendo 15 mM de NaCl.
<b>RIPA</b> + inhibidores de proteasas y fosfatasas	1% de NP-40, 0,5% de deoxicolato sódico (DOC) (Sigma), 0,1% de SDS (Fluka) en 50 mM de Tris-HCl pH 7,5; 150 mM de NaCl. Inhibidores de proteasas: 10 µg/ml de la mezcla LAP (Leupeptin, antipaína y pepstatina A), 5 mM de benzamidina, 100 µg/ml de soybean trypsin inhibitor, 20 µg/ml de aprotinina y 1 mM de PMSF. Inhibidores de fosfatasas: 1mM sodium orthovanadate, 10mM sodium fluoride, 1mM sodium pyrophosphate y 10mM beta-glycerophosphate.
<b>Sample buffer 2X</b>	125 mM de Tris-HCl pH 6,8, 20% de glicerol (Panreac), 5% de SDS (Fluka) y 0,002% de azul de bromofenol.
<b>Tampón Towbin</b>	25 mM Tris pH 8,3, 1,3 mM SDS (Fluka), 192 mM Glicina (Sigma) y 20% metanol (Merck).
<b>TBS-Tween + 5% leche</b>	20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 137 mM de NaCl y 1% de Tween 20 (Sigma). Añadir 5% leche en polvo y cuando sea necesario 0,01% de Azida (NaN <sub>3</sub> )(Merck).
<b>Tampón de stripping</b>	25 mM de Glycina-HCl, pH 2, conteniendo 1% SDS (Fluka).

## 2. Técnicas para el estudio de fosforilación.

### Marcaje con Ortofosfato

Células expresando diferentes formas moleculares de ArfGAP1 así como células transfectadas con el vector vacío fueron lavadas repetidamente con MM sin fosfato durante 1 hora. Posteriormente cada placa fue incubada a 37°C con 250 µCi de ortofosfato [<sup>32</sup>P] en MM sin fosfato conteniendo 25 mM de Hepes durante 1 hora (volumen total 0,9 µl/placa).

## **Fosforilación *in vitro* de ArfGAP1**

Para el análisis de la fosforilación *in vitro* se utilizaron las proteínas recombinantes ArfGAP1 y ArfGAP1 S360A obtenidas previamente. El experimento consistió en incubar 10 µg de cada proteína con 100U de Cα (Sigma) por un lado ó con 30U de LRKK2 (Life Technologies) por otro en 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10mM de MgCl<sub>2</sub> y 5 µCi de P<sup>32</sup>-ATP. El volumen final fue de 20 µl y se incubó a 30°C durante 30 minutos en termobloque con agitación ocasional. A la correspondiente muestra control no se le adicionó enzima alguna.

## **Desfosforilación con Fosfatasa Alcalina**

Las células transfectadas se procesaron de manera general tal y como se ha descrito en el punto *Inmunoprecipitación*, a excepción de las siguientes modificaciones.

Tras la lisis celular, el extracto fue igualmente homogenizado utilizando una aguja de 25G acoplada a una jeringa de insulina. Tras ese paso, la diferencia más importante radicó en que el extracto homogenizado fue sonicado. La sonicación consistió en 5 ciclos de 1 minuto de duración cada uno con 30 segundos de reposo entre ciclos. El sonicador (Sonifier 250, Branson) estuvo al 50% de constancia a un nivel 2-3. El extracto sonicado fue inmunoprecipitado con la matriz de GFP de la misma forma que se ha descrito anteriormente en el apartado *Inmunoprecipitación*.

Otra diferencia radicó en que el inmunoprecipitado fue eluido de la matriz calentando a 90°C durante 15 minutos con 100 µl de tampón de desfosforilación (50 mM de Tris-HCl pH 8,5 y 0,1 mM EDTA) . El volumen eluido fue repartido en dos tubos eppendorf (50 µl/tubo). A uno se le añadió 10 µl de tampón de desfosforilación y al otro se le añadió 10 U de la enzima fosfatasa alcalina (AP)(Roche) que corresponden con 10 µl de un stock de enzima de 1µg/µl. Las muestras se incubaron a 37°C durante 1 hora y, a continuación, fueron procesadas a 96°C durante 15 minutos con 15 µl de sample buffer 4X y 7,5 µl de 200 mM de DTT.



### 3. Técnicas para el análisis del transporte.

#### VSV-G

El análisis del transporte anterógrado se llevó a cabo tanto en células controles como en células silenciadas durante 72 horas. En el caso de las células silenciadas, los cultivos fueron lavados previamente con MC carente de antibióticos a fin de eliminar los restos del reactivo de silenciamiento. Las células, adheridas a cubreobjetos y en placa de 35 mm de diámetro, fueron lavadas previamente con MM (4 ó 5 veces) conteniendo el último lavado 25mM de Hepes. A continuación, las células fueron infectadas con 25 unidades formadoras de placas (pfu) por célula con el mutante termosensible ts045 del virus de la estomatitis vesicular (VSV-ts045), durante 45 min a 32°C. Tras la adsorción del virus a la superficie celular se eliminó el medio de infección y las células fueron incubadas a 40°C (temperatura restrictiva) durante 4 horas en MC conteniendo 25 mM de Hepes. Posteriormente, las células fueron incubadas en MC suplementado con 25 mM de Hepes y 100 µg/ml de cicloheximida (Sigma) a 32°C (temperatura permisiva) durante 1 hora. Para la detección de la proteína G del VSV (VSV-G) mediante inmunofluorescencia indirecta se utilizó el anticuerpo P5D4 dirigido contra el dominio citosólico de la proteína a fin de detectarla intracelularmente. Por otra parte, el anticuerpo 8G5F11 dirigido contra el ectodominio de la proteína fue utilizado para visualizarla en la membrana plasmática. En este último caso las células fijadas no fueron permeabilizadas y el anticuerpo se diluyó en PBS/BSA.

#### Toxina de Shiga

El análisis del transporte retrógrado se llevó a cabo, al igual que en el transporte anterógrado, tanto en células controles como en células silenciadas durante 72 horas. Tal como se especifica en el apartado anterior, en el caso de las células silenciadas, se eliminó previamente los restos del reactivo de silenciamiento. Las células, adheridas a cubreobjetos y en placa de 35 mm de diámetro, fueron lavadas con MM (4 ó 5 veces) conteniendo el último lavado 25mM de Hepes. A continuación, las células fueron incubadas a 4°C durante 1 hora en gota de 30 µl de MM conteniendo 25mM de Hepes y 2,2 µg/µl de la subunidad β

de la toxina de Shiga portando la secuencia KDEL y conjugada a Cy3 (Dr. L. Johanes, Instituto Curie, París, Francia). Trascurrido el tiempo de adsorción a la superficie celular, las células fueron lavadas con MM conteniendo 25mM de HEPES e incubadas durante 2 horas a 20°C en MC conteniendo 25 mM de HEPES. Tras ello, las células fueron transferidas a 37°C e incubadas durante 3 horas para permitir el transporte desde endosomas hasta el RE.

### **4. Técnicas de microscopía óptica**

#### **Inmunofluorescencia indirecta**

Una vez finalizado el tratamiento específico, las células crecidas sobre cubreobjetos fueron fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS durante 20-30 minutos ó en metanol frío (a -20°C) durante al menos 10 minutos. Tras lavar con PBS durante 30 minutos, las células se permeabilizaron durante 10 minutos con PBS/BSA/Saponina+Azida ó bien con Tritón X-100 ó bien con Tritón X-100/SDS/BSA, dependiendo del anticuerpo utilizado. Posteriormente se procedió a la incubación en gota durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda con el anticuerpo diluido en PBS/BSA/Saponina+Azida. Tras ello, las células fueron lavadas con PBS/BSA/Saponina+Azida durante 20-30 minutos y similarmente incubadas (30 minutos/37°C) en anticuerpo secundario diluido en el mismo tampón. Finalmente, las muestras fueron lavadas abundantemente con PBS y montadas en portaobjetos con el medio de montaje Fluoromount-G (SouthernBiotech) conteniendo 0,05 µg/ml de Hoechst 33342 (Sigma).

Todas las imágenes fueron captadas mediante microscopía confocal, usando el sistema Zeiss modelo LSM DUO ó, alternativamente, el sistema Leica TCS SP2.

A continuación, en la Tabla VII se detallan todos los tampones y productos utilizados en *Inmunofluorescencia indirecta*.

<b>Tabla VII. Tampones y productos utilizados en Inmunofluorescencia indirecta.</b>	
<b>Tampón/Producto</b>	<b>Composición y Concentración</b>
Paraformaldehido	4% de paraformaldehido (Merck) en PBS (Amresco).
Metanol	Metanol absoluto (Merck).
PBS/BSA/Saponina+Azida	0,5% de BSA (albúmina de suero bovino) (Sigma), 0,05% de Saponina (Sigma), 0,01% de Azida (NaN <sub>3</sub> ) (Merck) en PBS (Amresco)
Tritón X-100	0,2% de Tritón X-100 (Sigma) en PBS (Amresco).
Tritón X-100/SDS/BSA	0,2% de Tritón X-100 (Sigma), 0,5% de SDS (Fluka) y 0,5% de BSA (Sigma) en PBS (Amresco).

### **Observación de células vivas al microscopio óptico**

Utilizamos células adheridas a placas de 35 mm de diámetro conteniendo como superficie de fondo un cubreobjeto (MatTek). A lo largo del experimento las células fueron mantenidas en medio MEM sin rojo fenol, suplementado con 25 mM de Hepes y monitorizadas en un microscopio invertido (Zeiss AxioObserver Z1 ó Leica DM IRE2) dotado de sistema de control de temperatura y CO<sub>2</sub>. Durante la realización de los experimentos, las condiciones de irradiación y adquisición de imágenes fueron ajustadas con el fin de minimizar el daño celular y, al mismo tiempo, favorecer la estabilidad de las moléculas fluorescentes detectadas.

### **Fluorescencia total asociadas a membranas**

Para el análisis cuantitativo de la fluorescencia total asociada a membranas se realizó la captura de una serie consecutiva de imágenes (*stack*) rastreando a lo largo del eje z ( $z\text{-step} = 0,2 \mu\text{m}$ ) para abarcar toda la profundidad. A partir de estas secciones ópticas fue generada una imagen final representativa de toda la serie denominada “proyección de máxima intensidad” (PMI) donde cada pixel representa el valor máximo obtenido a lo largo de todo el eje z. A esta imagen le fue sustraído el fondo mediante la aplicación NIH Image v. 1.63. Posteriormente se

ejecutó un proceso de conversión denominado umbralización (*thresholding*) que divide la imagen digital en zonas aisladas con significado propio. La fluorescencia total asociada a membranas se obtuvo como el sumatorio de la intensidad de fluorescencia en escala de grises de todos los píxeles de cada zona. Finalmente estos valores fueron expresados en porcentaje (%).

### **FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)**

Para analizar la capacidad de asociación al complejo de Golgi de las proteínas ArfGAP1-YFP y ArfGAP1 S360A-YFP se utilizó la técnica de FRAP. Este análisis se llevó a cabo en células vivas sembradas en las placas de cultivo descritas anteriormente que expresaban dichas construcciones.

La técnica consistió en delimitar manualmente la región del complejo de Golgi y dicha área fue excitada selectivamente con una intensidad de láser entre 80 y 100%, de forma que logramos eliminar la fluorescencia de las proteínas asociadas al orgánulo en ese instante. Para establecer un valor basal de fluorescencia antes del pulso de alta intensidad (bleaching) se tomaron 3 ó 4 imágenes previas con intensidad baja de iluminación (6-9%). Esta misma condición se aplicó para la captura de imágenes después de la irradiación de alta intensidad. La recuperación de fluorescencia después del bleaching fue monotorizada cada 10 segundos.

La captura de imágenes se realizó con los sistemas de microscopía confocal mencionados usando la línea 514 nm del láser de argón. Se tomaron imágenes no saturadas con el objetivo 63x (NA 1.4, oil) y un diámetro de pinhole equivalente a 4-5 unidades Airy. Para medir las intensidades de fluorescencia asociada a Golgi se utilizó el software propio del microscopio confocal y, para su representación, se utilizó la opción de gráfica del programa Excel. En cada punto se representó la relación fluorescencia de Golgi/fluorescencia total de la célula dividido por el ratio antes de la irradiación a alta intensidad. Además, el valor de fluorescencia de fondo fue sustraído del valor de fluorescencia total de la célula y del valor de fluorescencia asociada (Liu *et al*, 2005).

## **FLIP ( Fluorescence Loss In Photobleaching)**

Para estudiar la dinámica de disociación de las proteínas ArfGAP1-YFP y ArfGAP1 S360A-YFP utilizamos la técnica de FLIP. Durante el análisis, las células se trataron de la misma manera y bajo las mismas condiciones que en FRAP.

Esta técnica consistió en delimitar manualmente el área total de la célula, con excepción de la ocupada por el complejo de Golgi, para irradiar de forma selectiva dicha zona. La pérdida de fluorescencia asociada al Golgi fue evaluada mediante captación de imágenes cada 10 segundos con baja intensidad de láser (7-9%). Paralelamente, y cada 40 segundos, el área seleccionada fue irradiada a una intensidad de láser del 40-50%. La captura, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia asociada a Golgi y la representación de los datos se realizaron en las mismas condiciones que en FRAP.

## **Adquisición de imágenes**

El análisis y captura definitiva de imágenes se realizó en los sistemas de microscopía confocal ya referidos. Como condiciones generales se utilizó un objetivo 63x (N.A. 1.4, oil), el formato de las imágenes fue 512 x 512 píxeles y la velocidad de rastreo del láser de 400 Hz. Las imágenes fueron capturadas con resolución 8-bit.

## **5. Técnicas de microscopía electrónica**

### **Microscopía electrónica**

Células expresando ArfGAP1-YFP ó ArfGAP1 S360A-YFP fueron fijadas con 1% de glutaraldehído en tampón cacodilato sódico-HCl 0,1 M pH 7,4 durante 1 hora. Posteriormente, las células se lavaron en tampón cacodilato sódico-HCl 0,1 M pH 7,4. La post-fijación se realizó a 4°C en la mezcla 1% OsO<sub>4</sub> /1% de K<sub>4</sub> Fe (CN)<sub>6</sub> en el mismo tampón. Las muestras fueron lavadas abundantemente con agua destilada y, alternativamente, incubadas con 1% de ácido tánico en agua destilada durante 1 hora. Tras lavar de nuevo con agua destilada, fueron incubadas en 1% de acetato de uranilo en agua destilada durante 1 hora. Finalmente, las muestras

fueron deshidratadas en soluciones de etanol de gradación creciente e incluidas en resina Epon 812. Las secciones finas obtenidas en ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung) fueron teñidas con 0,008 M de citrato de plomo y observadas en un microscopio Philips CM-10.

## **BIBLIOGRAFÍA**





Adolf F, Herrmann A, Hellwig A, Beck R, Brugger B, Wieland FT (2013) Scission of COPI and COPII vesicles is independent of GTP hydrolysis. *Traffic* **14**: 922-932

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

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

Antonny B, Huber I, Paris S, Chabre M, Cassel D (1997) Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *The Journal of biological chemistry* **272**: 30848-30851

Aoe T, Cukierman E, Lee A, Cassel D, Peters PJ, Hsu VW (1997) The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *The EMBO journal* **16**: 7305-7316

Aoe T, Lee AJ, van Donselaar E, Peters PJ, Hsu VW (1998) Modulation of intracellular transport by transported proteins: insight from regulation of COPI-mediated transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1624-1629

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

Beck R, Adolf F, Weimer C, Bruegger B, Wieland FT (2009) ArfGAP1 activity and COPI vesicle biogenesis. *Traffic* **10**: 307-315

Beck R, Prinz S, Diestelkötter-Bachert P, Rohling S, Adolf F, Hoehner K, Welsch S, Ronchi P, Brugger B, Briggs JA, Wieland F (2011) Coatamer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *The Journal of cell biology* **194**: 765-777

Bejarano E, Cabrera M, Vega L, Hidalgo J, Velasco A (2006) Golgi structural stability and biogenesis depend on associated PKA activity. *Journal of cell science* **119**: 3764-3775

Bethune J, Kol M, Hoffmann J, Reckmann I, Brugger B, Wieland F (2006) Coatamer, the coat protein of COPI transport vesicles, discriminates endoplasmic reticulum residents from p24 proteins. *Molecular and cellular biology* **26**: 8011-8021

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

Bigay J, Casella JF, Drin G, Mesmin B, Antonny B (2005) ArfGAP1 responds to membrane curvature through the folding of a lipid packing sensor motif. *The EMBO journal* **24**: 2244-2253

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

Blader IJ, Cope MJ, Jackson TR, Profit AA, Greenwood AF, Drubin DG, Prestwich GD, Theibert AB (1999) GCS1, an Arf guanosine triphosphatase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for normal actin cytoskeletal organization in vivo and stimulates actin polymerization in vitro. *Molecular biology of the cell* **10**: 581-596

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

Borner GH, Harbour M, Hester S, Lilley KS, Robinson MS (2006) Comparative proteomics of clathrin-coated vesicles. *The Journal of cell biology* **175**: 571-578

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

Budnik A, Stephens DJ (2009) ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS letters* **583**: 3796-3803

Cabrera M, Muniz M, Hidalgo J, Vega L, Martin ME, Velasco A (2003) The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Molecular biology of the cell* **14**: 4114-4125

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

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

Chavrier P, Goud B (1999) The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Current opinion in cell biology* **11**: 466-475

Chia PZ, Gleeson PA (2014) Membrane tethering. *F1000prime reports* **6**: 74

Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 2172-2175

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

Cukierman E, Huber I, Rotman M, Cassel D (1995) The ARF1 GTPase-activating protein: zinc finger motif and Golgi complex localization. *Science* **270**: 1999-2002

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

Dancourt J, Barlowe C (2010) Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annual review of biochemistry* **79**: 777-802

Donaldson JG (2000) Filling in the GAPs in the ADP-ribosylation factor story. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3792-3794

Drin G, Morello V, Casella JF, Gounon P, Antonny B (2008) Asymmetric tethering of flat and curved lipid membranes by a golgin. *Science* **320**: 670-673

Dumaresq-Doiron K, Savard MF, Akam S, Costantino S, Lefrancois S (2010) The phosphatidylinositol 4-kinase PI4KIIIalpha is required for the recruitment of GBF1 to Golgi membranes. *Journal of cell science* **123**: 2273-2280

Fiedler K, Veit M, Stamnes MA, Rothman JE (1996) Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**: 1396-1399

Frigerio G, Grimsey N, Dale M, Majoul I, Duden R (2007) Two human ARFGAPs associated with COP-I-coated vesicles. *Traffic* **8**: 1644-1655

Fullekrug J, Sonnichsen B, Schafer U, Nguyen Van P, Soling HD, Mieskes G (1997) Characterization of brefeldin A induced vesicular structures containing cycling proteins of the intermediate compartment/cis-Golgi network. *FEBS letters* **404**: 75-81

Gannon J, Fernandez-Rodriguez J, Alamri H, Feng SB, Kalantari F, Negi S, Wong AH, Mazur A, Asp L, Fazel A, Salman A, Lazaris A, Metrakos P, Bergeron JJ, Nilsson T (2014) ARFGAP1 is dynamically associated with lipid droplets in hepatocytes. *PLoS one* **9**: e111309

Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T, Bergeron JJ (2006) Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* **127**: 1265-1281

Goldberg J (1999) Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatomer in GTP hydrolysis. *Cell* **96**: 893-902

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

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

Hara-Kuge S, Kuge O, Orci L, Amherdt M, Ravazzola M, Wieland FT, Rothman JE (1994) En bloc incorporation of coatomer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *The Journal of cell biology* **124**: 883-892

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

Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59

Holthuis JC, Burger KN (2003) Sensing membrane curvature. *Developmental cell* **5**: 821-822

Hsia KC, Hoelz A (2010) Crystal structure of alpha-COP in complex with epsilon-COP provides insight into the architecture of the COPI vesicular coat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 11271-11276

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

Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal* **9**: 3153-3162

Janson IM, Toomik R, O'Farrell F, Ek P (1998) KDEL motif interacts with a specific sequence in mammalian erd2 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **247**: 447-451

Kartberg F, Asp L, Dejgaard SY, Smedh M, Fernandez-Rodriguez J, Nilsson T, Presley JF (2010) ARFGAP2 and ARFGAP3 are essential for COPI coat assembly on the Golgi membrane of living cells. *The Journal of biological chemistry* **285**: 36709-36720

Kawasaki M, Nakayama K, Wakatsuki S (2005) Membrane recruitment of effector proteins by Arf and Rab GTPases. *Current opinion in structural biology* **15**: 681-689

Kim W, Kim SY, Kim T, Kim M, Bae DJ, Choi HI, Kim IS, Jho E (2013) ADP-ribosylation factors 1 and 6 regulate Wnt/beta-catenin signaling via control of LRP6 phosphorylation. *Oncogene* **32**: 3390-3396

Kliouchnikov L, Bigay J, Mesmin B, Parnis A, Rawet M, Goldfeder N, Antony B, Cassel D (2009) Discrete determinants in ArfGAP2/3 conferring Golgi localization and regulation by the COPI coat. *Molecular biology of the cell* **20**: 859-869

Kuehn MJ, Herrmann JM, Schekman R (1998) COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* **391**: 187-190

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Langer JD, Roth CM, Bethune J, Stoops EH, Brugger B, Herten DP, Wieland FT (2008) A conformational change in the alpha-subunit of coatamer induced by ligand binding to gamma-COP revealed by single-pair FRET. *Traffic* **9**: 597-607

Lanoix J, Ouwendijk J, Lin CC, Stark A, Love HD, Ostermann J, Nilsson T (1999) GTP hydrolysis by arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COP I vesicles. *The EMBO journal* **18**: 4935-4948

Lanoix J, Ouwendijk J, Stark A, Szafer E, Cassel D, Dejgaard K, Weiss M, Nilsson T (2001) Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1. *The Journal of cell biology* **155**: 1199-1212

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

Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual review of cell and developmental biology* **20**: 87-123

Lee MC, Orci L, Hamamoto S, Futai E, Ravazzola M, Schekman R (2005a) Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* **122**: 605-617

Lee SY, Yang JS, Hong W, Premont RT, Hsu VW (2005b) ARFGAP1 plays a central role in coupling COPI cargo sorting with vesicle formation. *The Journal of cell biology* **168**: 281-290

Lewis SM, Poon PP, Singer RA, Johnston GC, Spang A (2004) The ArfGAP Glo3 is required for the generation of COPI vesicles. *Molecular biology of the cell* **15**: 4064-4072

Liu W, Duden R, Phair RD, Lippincott-Schwartz J (2005) ArfGAP1 dynamics and its role in COPI coat assembly on Golgi membranes of living cells. *The Journal of cell biology* **168**: 1053-1063

Long KR, Yamamoto Y, Baker AL, Watkins SC, Coyne CB, Conway JF, Aridor M (2010) Sar1 assembly regulates membrane constriction and ER export. *The Journal of cell biology* **190**: 115-128

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

Love HD, Lin CC, Short CS, Ostermann J (1998) Isolation of functional Golgi-derived vesicles with a possible role in retrograde transport. *The Journal of cell biology* **140**: 541-551

Luo R, Ha VL, Hayashi R, Randazzo PA (2009) Arf GAP2 is positively regulated by coatamer and cargo. *Cellular signalling* **21**: 1169-1179

Luo R, Randazzo PA (2008) Kinetic analysis of Arf GAP1 indicates a regulatory role for coatamer. *The Journal of biological chemistry* **283**: 21965-21977

Makler V, Cukierman E, Rotman M, Admon A, Cassel D (1995) ADP-ribosylation factor-directed GTPase-activating protein. Purification and partial characterization. *The Journal of biological chemistry* **270**: 5232-5237

Mandiyan V, Andreev J, Schlessinger J, Hubbard SR (1999) Crystal structure of the ARF-GAP domain and ankyrin repeats of PYK2-associated protein beta. *The EMBO journal* **18**: 6890-6898

Mansour SJ, Skaug J, Zhao XH, Giordano J, Scherer SW, Melancon P (1999) p200 ARF-GEP1: a Golgi-localized guanine nucleotide exchange protein whose Sec7 domain is targeted by the drug brefeldin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 7968-7973

Mavillard F, Hidalgo J, Megias D, Levitsky KL, Velasco A (2010) PKA-mediated Golgi remodeling during cAMP signal transmission. *Traffic* **11**: 90-109

Mesmin B, Drin G, Levi S, Rawet M, Cassel D, Bigay J, Antonny B (2007) Two lipid-packing sensor motifs contribute to the sensitivity of ArfGAP1 to membrane curvature. *Biochemistry* **46**: 1779-1790

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

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

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

Muniz M, Alonso M, Hidalgo J, Velasco A (1996) A regulatory role for cAMP-dependent protein kinase in protein traffic along the exocytic route. *The Journal of biological chemistry* **271**: 30935-30941

Muniz M, Martin ME, Hidalgo J, Velasco A (1997) Protein kinase A activity is required for the budding of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 14461-14466

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

Nickel W, Malsam J, Gorgas K, Ravazzola M, Jenne N, Helms JB, Wieland FT (1998) Uptake by COPI-coated vesicles of both anterograde and retrograde cargo is inhibited by GTPgammaS in vitro. *Journal of cell science* **111 ( Pt 20)**: 3081-3090

Orci L, Perrelet A, Rothman JE (1998) Vesicles on strings: morphological evidence for processive transport within the Golgi stack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 2279-2283

Orci L, Stannes M, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Sollner TH, Rothman JE (1997) Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**: 335-349

Parnis A, Rawet M, Regev L, Barkan B, Rotman M, Gaitner M, Cassel D (2006) Golgi localization determinants in ArfGAP1 and in new tissue-specific ArfGAP1 isoforms. *The Journal of biological chemistry* **281**: 3785-3792

Pepperkok R, Whitney JA, Gomez M, Kreis TE (2000) COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *Journal of cell science* **113 ( Pt 1)**: 135-144

Poon PP, Cassel D, Spang A, Rotman M, Pick E, Singer RA, Johnston GC (1999) Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *The EMBO journal* **18**: 555-564



Popoff V, Adolf F, Brugger B, Wieland F (2011) COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**: a005231

Presley JF, Ward TH, Pfeifer AC, Siggia ED, Phair RD, Lippincott-Schwartz J (2002) Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature* **417**: 187-193

Rabouille C, Klumperman J (2005) Opinion: The maturing role of COPI vesicles in intra-Golgi transport. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**: 812-817

Randazzo PA, Kahn RA (1994) GTP hydrolysis by ADP-ribosylation factor is dependent on both an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein and acid phospholipids. *The Journal of biological chemistry* **269**: 10758-10763

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

Reinhard C, Harter C, Bremser M, Brugger B, Sohn K, Helms JB, Wieland F (1999) Receptor-induced polymerization of coatomer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 1224-1228

Reinhard C, Schweikert M, Wieland FT, Nickel W (2003) Functional reconstitution of COPI coat assembly and disassembly using chemically defined components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8253-8257

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

Robineau S, Chabre M, Antony B (2000) Binding site of brefeldin A at the interface between the small G protein ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and the nucleotide-exchange factor Sec7 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 9913-9918

Saitoh A, Shin HW, Yamada A, Waguri S, Nakayama K (2009) Three homologous ArfGAPs participate in coat protein I-mediated transport. *The Journal of biological chemistry* **284**: 13948-13957

Salama NR, Schekman RW (1995) The role of coat proteins in the biosynthesis of secretory proteins. *Current opinion in cell biology* **7**: 536-543

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

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

Schutze MP, Peterson PA, Jackson MR (1994) An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal* **13**: 1696-1705

Schweizer A, Fransen JA, Matter K, Kreis TE, Ginsel L, Hauri HP (1990) Identification of an intermediate compartment involved in protein transport from endoplasmic reticulum to Golgi apparatus. *European journal of cell biology* **53**: 185-196

Schweizer A, Matter K, Ketcham CM, Hauri HP (1991) The isolated ER-Golgi intermediate compartment exhibits properties that are different from ER and cis-Golgi. *The Journal of cell biology* **113**: 45-54

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

Shiba Y, Luo R, Hinshaw JE, Szul T, Hayashi R, Sztul E, Nagashima K, Baxa U, Randazzo PA (2011) ArfGAP1 promotes COPI vesicle formation by facilitating coatomer polymerization. *Cellular logistics* **1**: 139-154

Shin HW, Morinaga N, Noda M, Nakayama K (2004) BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Molecular biology of the cell* **15**: 5283-5294

Shinotsuka C, Yoshida Y, Kawamoto K, Takatsu H, Nakayama K (2002) Overexpression of an ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor, BIG2, uncouples brefeldin A-induced adaptor protein-1 coat dissociation and membrane tubulation. *The Journal of biological chemistry* **277**: 9468-9473

Siu KY, Yu MK, Wu X, Zong M, Roth MG, Chan HC, Yu S (2011) The non-catalytic carboxyl-terminal domain of ARFGAP1 regulates actin cytoskeleton reorganization by antagonizing the activation of Rac1. *PloS one* **6**: e18458

Spang A, Matsuoka K, Hamamoto S, Schekman R, Orci L (1998) Coatamer, Arf1p, and nucleotide are required to bud coat protein complex I-coated vesicles from large synthetic liposomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 11199-11204

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

Stafa K, Trancikova A, Webber PJ, Glauser L, West AB, Moore DJ (2012) GTPase activity and neuronal toxicity of Parkinson's disease-associated LRRK2 is regulated by ArfGAP1. *PLoS genetics* **8**: e1002526

Storrie B, Pepperkok R, Nilsson T (2000) Breaking the COPI monopoly on Golgi recycling. *Trends in cell biology* **10**: 385-391

Strating JR, Martens GJ (2009) The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **101**: 495-509

Sun Z, Anderl F, Frohlich K, Zhao L, Hanke S, Brugger B, Wieland F, Bethune J (2007) Multiple and stepwise interactions between coatamer and ADP-ribosylation factor-1 (Arf1)-GTP. *Traffic* **8**: 582-593

Szafer E, Pick E, Rotman M, Zuck S, Huber I, Cassel D (2000) Role of coatamer and phospholipids in GTPase-activating protein-dependent hydrolysis of GTP by ADP-ribosylation factor-1. *The Journal of biological chemistry* **275**: 23615-23619

Szafer E, Rotman M, Cassel D (2001) Regulation of GTP hydrolysis on ADP-ribosylation factor-1 at the Golgi membrane. *The Journal of biological chemistry* **276**: 47834-47839

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 4350-4354

Waters MG, Serafini T, Rothman JE (1991) 'Coatamer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature* **349**: 248-251

Weidman P, Roth R, Heuser J (1993) Golgi membrane dynamics imaged by freeze-etch electron microscopy: views of different membrane coatings involved in tubulation versus vesiculation. *Cell* **75**: 123-133

Weimer C, Beck R, Eckert P, Reckmann I, Moelleken J, Brugger B, Wieland F (2008) Differential roles of ArfGAP1, ArfGAP2, and ArfGAP3 in COPI trafficking. *The Journal of cell biology* **183**: 725-735

Weiss M, Nilsson T (2003) A kinetic proof-reading mechanism for protein sorting. *Traffic* **4**: 65-73

Xiong Y, Yuan C, Chen R, Dawson TM, Dawson VL (2012) ArfGAP1 is a GTPase activating protein for LRRK2: reciprocal regulation of ArfGAP1 by LRRK2. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**: 3877-3886

Yang JS, Lee SY, Gao M, Bourgoïn S, Randazzo PA, Premont RT, Hsu VW (2002) ARFGAP1 promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat. *The Journal of cell biology* **159**: 69-78

Yang JS, Lee SY, Spano S, Gad H, Zhang L, Nie Z, Bonazzi M, Corda D, Luini A, Hsu VW (2005) A role for BARS at the fission step of COPI vesicle formation from Golgi membrane. *The EMBO journal* **24**: 4133-4143

Yu S, Roth MG (2002) Casein kinase I regulates membrane binding by ARF GAP1. *Molecular biology of the cell* **13**: 2559-2570

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

Zhang CJ, Bowzard JB, Anido A, Kahn RA (2003) Four ARF GAPs in *Saccharomyces cerevisiae* have both overlapping and distinct functions. *Yeast* **20**: 315-330

Zhang CJ, Cavenagh MM, Kahn RA (1998) A family of Arf effectors defined as suppressors of the loss of Arf function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **273**: 19792-19796

Zhang CJ, Rosenwald AG, Willingham MC, Skuntz S, Clark J, Kahn RA (1994) Expression of a dominant allele of human ARF1 inhibits membrane traffic in vivo. *The Journal of cell biology* **124**: 289-300

Zhao L, Helms JB, Brugger B, Harter C, Martoglio B, Graf R, Brunner J, Wieland FT (1997) Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 4418-4423

Zhao L, Helms JB, Brunner J, Wieland FT (1999) GTP-dependent binding of ADP-ribosylation factor to coatamer in close proximity to the binding site for dilysine retrieval motifs and p23. *The Journal of biological chemistry* **274**: 14198-14203

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





