

# **“Mecanismos celulares y moleculares que regulan el transporte de membranas en células secretoras”**

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas

**Lic. Iris Alejandra García**

Director de Tesis: Dra. Cecilia Inés Álvarez



**FCQ**  
Facultad de  
Ciencias Químicas



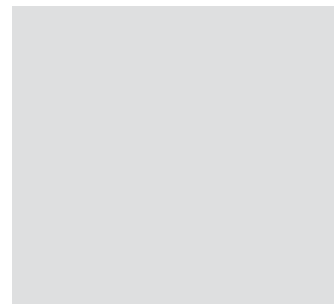
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología  
(CIBICI-CONICET)

Departamento de Bioquímica Clínica  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

**2015**

## **DIRECTORA DE TESIS**

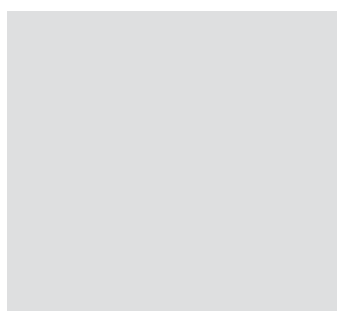
---



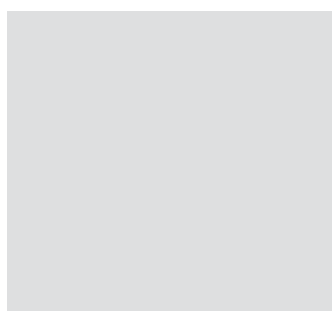
Dra. Cecilia I. Alvarez

## **COMISIÓN EVALUADORA**

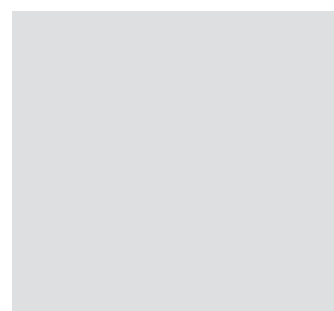
---



Dra. Beatriz Caputto



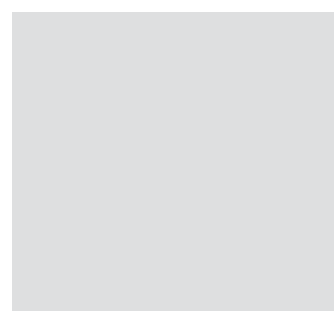
Dra. Julia Cambiasso



Dr. Gustavo Chiabrando

## **EVALUADORA EXTERNA**

---



Dra. Claudia Banchio

“

*A veces sentimos que lo que  
hacemos es tan solo una gota en  
el mar, pero el mar sería menos  
si le faltara esa gota.*

**Madre Teresa de Calcuta**

# Agradecimientos



“Puedes diseñar, crear y construir el lugar más maravilloso del mundo, pero hacen falta personas para convertir el sueño en realidad”.

**Walt Disney**

En primer lugar quiero agradecer a mi familia. A mis viejos, Iris y Jorge, ¡gracias por todo! Por ayudarme a cumplir mis metas y motivarme siempre a ir por más. Por apoyarme en mis decisiones y demostrarme que con esfuerzo se puede llegar lejos. A mis hermanos, Pao, Mario y Ricky, por la complicidad, por enseñarme a perdonar y a pedir perdón (creo que faltaron un par de clases). Por ser mis compañeros de toda la vida. A mi cuñado, Paulo, por ser un hermano más.

A mis sobrinos, Luz, Fede y Tomi, por alegrarme la vida. A mis abuelos, por regalarme hermosos recuerdos y esta hermosa familia.

Quiero agradecer a la Dra. Cecilia Alvarez, por recibirme en su laboratorio y brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades con criterio, a confiar en mis capacidades y a nunca darme por vencida.

A mi comisión evaluadora, Dra. Beatriz Caputto; Dra. Julia Cambiasso y Dr. Gustavo Chiabrando, gracias por el seguimiento durante todos estos años y las sugerencias para sacar el mayor provecho de este trabajo de tesis. Gracias por contribuir con mi formación.

A la Dra. Claudia Banchio, por acceder a evaluar esta tesis y por establecer una colaboración con nuestro proyecto.

Agradezco el apoyo económico brindado por CONICET, FONCyT, SECyT-UNC e INC, sin el cual no habría sido posible realizar este trabajo doctoral.

A la Facultad de Ciencias Químicas, particularmente al departamento de Bioquímica

Clínica, gracias por brindarme un espacio para que pueda desarrollar mi tesis doctoral y convertirse en mi segundo hogar, donde pasé muchas horas de mi vida en buena compañía.

A los principales creadores del laboratorio 119-120, Dr. Luis Patrino y Dr. Alfredo Flury, a quienes tuve el placer de conocer y me transmitieron su pasión por la ciencia y la dedicación al trabajo. A los demás directores del laboratorio 119-120 por ayudarme con sus consejos y recomendaciones.

A mis compañeros del laboratorio 119-120, que más que compañeros son amigos. A los que estuvieron al principio, por muchos años, por algunos meses, a los que siempre estuvieron y a los que recién llegan. Gracias por generar un hermoso ambiente de trabajo con la calidez de un hogar, donde se comparte más tiempo que con cualquier otra persona. Por transmitirme sus conocimientos y darme una mano siempre que lo necesité. Por sacarme una sonrisa cuando las cosas se complicaban. Particularmente quiero agradecer a mis compañeros de grupo. A los más viejitos, que me brindaron los cimientos para llevar a cabo la enorme tarea de investigar. A los más nuevos, por aportar frescura al grupo, por la predisposición y la buena onda. A miniLu, por su dulzura, su capacidad de estar en todos los detalles y siempre tener palabras de aliento. Sos una gran amiga. A Hernán, ¡gracias por compartir todos estos años conmigo y haber generado esta linda amistad!, por ser tan shenshible y todavía aguantarme. Espero sigamos apostando por muchos años más.

Al resto de mis colegas del departamento, con algunos de los cuales establecí una hermosa amistad. Gracias por las charlas de pasillo y por las escapadas turísticas en algún que otro curso/congreso. También, a todos los directores y profesores del departamento, por atender mis dudas, facilitarme reactivos, y hasta por confiar en mí al momento de poner a punto una técnica o realizar experimentos en colaboración. Gracias, también, por el vínculo de amistad que pude formar con alguno de ellos.

Al personal de apoyo, técnicos y secretarios, quienes colaboraron con muy buena predisposición en este trabajo asistiéndome y enseñándome a manejar distintas herramientas metodológicas; cooperaron en tareas diarias de laboratorio y facilitaron trámites administrativos.

A mis amigos, que gracias a la vida no son pocos. Por ser mi cable a tierra. Por prestarme sus orejas y hombros, por darme fuertes abrazos cuando más hacen falta y cuando no, también. Por ser generadores de buenos momentos.

Y por último, pero no menos importante, a Javi. Gracias por demostrarme incondicionalidad, por aceptarme con todos mis defectos (que no son pocos), por el respeto y la paciencia... ¡sobre todo la paciencia! Gracias por enseñarme que la felicidad se alcanza cuando se hace feliz a la persona que uno ama, y vos me hacés feliz. Gracias por complementarme y regalarme hermosos momentos. También, gracias a su familia por hacerme sentir parte.

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>ABREVIATURAS</b>
<b>4</b>	<b>RESUMEN</b>
<b>6</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>
	<b>Transporte vesicular o de membranas (8)</b>
	Vía secretora de proteínas (10)
	Factores que regulan el transporte de membranas en la vía secretora (13)
	Rabs GTPasas (19)
	Rab1b en la interfase RE-Golgi (20)
	Hipótesis I (22)
	<b>Coordinación del transporte de membranas (23)</b>
	Respuesta a proteínas no plegadas (UPR) (24)
	Factores de transcripción de la familia CREB3 (25)
	Hipótesis II (28)
	Modelo de Trabajo (29)
<b>32</b>	<b>OBJETIVOS</b>
	Objetivo general (33)
	Objetivos específicos (33)
<b>34</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>
	1. Cultivo de líneas celulares eucariotas (35)
	2. Construcciones de plásmidos (36)
	3. Células bacterianas (36)
	3.1 Preparación de bacterias (36)
	3.2 Transformación de bacterias por electroporación (37)
	3.3 Purificación de plásmidos (37)
	4. Transfección de líneas celulares (38)
	5. Análisis proteico: Inmunomarcaciones y Western blot (39)

- 5.1 Inmunofluorescencias sobre células (39)
  - 5.1.1 Anticuerpos utilizados (40)
- 5.2. Detección de proteínas por ensayos de Western blot (41)
  - 5.2.1 Preparación de extractos proteicos celulares totales (41)
  - 5.2.2 Determinación de la concentración de proteínas. Método de Bradford (41)
  - 5.2.3 Separación de proteínas por peso molecular en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) (42)
  - 5.2.4 Anticuerpos utilizados (43)
- 6. Co-inmunoprecipitación (44)
  - 6.1 Preparación de extractos proteicos celulares totales (44)
  - 6.2 Preparación de las partículas magnéticas de proteína G Agarosa y unión del anticuerpo (45)
  - 6.3 Unión de la proteína blanco al anticuerpo presente en las partículas magnéticas de proteína G Agarosa (45)
- 7. Ensayos de recuperación de la fluorescencia luego del foto-blanqueado (FRAP) (46)
- 8. Determinación de niveles de transcripto (47)
  - 8.1 Purificación de ácido ribonucleico (ARN) total de células eucariotas en cultivo (47)
  - 8.2 Reacción de Transcripción Reversa: Conversión de ARN a ácido desoxirribonucleico copia (ADNc) (48)
  - 8.3 Amplificación semicuantitativa de ADNc de  $\beta$ -Actina por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (48)
  - 8.4 Amplificación cuantitativa de ADNc por PCR a tiempo real (qPCR) (49)
- 9. Microscopía electrónica (50)
- 10. Evaluación de proliferación celular: Ensayo de captación de Bromodeoxiuridina (BrdU) (50)
- 11. Análisis Estadístico (51)

**RESULTADOS****Capítulo I: Rol de Rab1b en la dinámica y función de COPII (53)**

- 1.1 Rab1b interacciona con componentes de COPII *in vivo* (53)
- 1.2 La inhibición de Rab1b modifica el fenotipo de COPII (55)
- 1.3 Rab1b modula la dinámica de asociación/disociación de COPII a membranas (56)
- 1.4 Conclusiones Capítulo I (58)

**Capítulo II: Cambios moleculares y estructurales en células tiroideas en respuesta a TSH (58)**

- 2.1 TSH incrementa los niveles proteicos de factores de transporte (59)
- 2.2 TSH incrementa los niveles de transcritos de genes que codifican a factores de transporte (62)
- 2.3 TSH incrementa el volumen del complejo de Golgi (63)
- 2.4 TSH no induce proliferación de células FRTL-5 luego de 24 horas de tratamiento (66)
- 2.5 Conclusiones Capítulo II (67)

**Capítulo III: Mecanismos que regulan cambios en los factores de transporte en respuesta a TSH (68)**

- 3.1 La cinética de expresión de proteínas de transporte en función a TSH es similar a la de NIS (68)
- 3.2 Forskolina mimetiza el efecto de TSH provocando cambios en los niveles de factores de transporte (71)
- 3.3 Las regiones regulatorias de los genes que codifican a factores de transporte contienen elementos respondedores a AMPc (73)
- 3.4 El factor de transcripción CREB3L1 se activa en respuesta a TSH (75)
- 3.5 CREB3L1 promueve el incremento del volumen del complejo de Golgi (77)
- 3.6 Conclusiones Capítulo III (80)

**DISCUSIÓN**

- Rol de Rab1b en la dinámica y función de COPII (83)
- Cambios moleculares y estructurales en células tiroideas en respuesta a TSH (85)
- Impacto y perspectivas (92)

**BIBLIOGRAFÍA**



ADN	Ácido <u>D</u> esoxirribonucleico
ADNc	<u>ADN</u> copia o <u>c</u> omplementario
ADP	<u>A</u> denosín <u>D</u> ifosfato
AMPc	<u>A</u> denosín <u>M</u> onofosfato <u>C</u> íclico
ARN	Ácido <u>R</u> ibonucleico
ARNasas	Enzimas que degradan <u>ARN</u>
ARNm	<u>ARN</u> mensajero
Arf	Factor de ribosilación de ADP (" <u>ADP-Ribosylation Factor</u> ")
ATP	<u>A</u> denosín <u>T</u> rifosfato
BrdU	<u>B</u> romodeoxiuridina
BFA	<u>B</u> refeldin <u>A</u>
BSA	Albúmina sérica bovina (" <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin")
bZIP	Región básica de cremallera de leucinas (" <u>B</u> asic <u>L</u> eucine <u>Z</u> ipper <u>D</u> omain")
CA	<u>C</u> onstitutivamente <u>a</u> ctivo
CFP	Proteína Fluorescente Cian (" <u>C</u> yan <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein")
COPI	Complejo de cubierta tipo I (" <u>C</u> oat <u>P</u> rotein <u>I</u> ")
COPII	Complejo de cubierta tipo II (" <u>C</u> oat <u>P</u> rotein <u>II</u> ")
CRE	Elemento de respuesta a AMPc (" <u>c</u> AMP <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement")
CREB	Proteínas de unión a CRE (" <u>c</u> AMP <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement- <u>B</u> inding protein")
CREB3L	Proteínas tipo CREB 3 (" <u>c</u> AMP <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement- <u>B</u> inding protein <u>3</u> - <u>L</u> ike")
DE	<u>D</u> esviación <u>E</u> stándar
DMEM	Medio de cultivo comercial (" <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium")
DMEM/F12	Medio de cultivo comercial (" <u>DMEM</u> : Nutrient Mixture <u>F-12</u> ")
DN	<u>D</u> ominante <u>N</u> egativa
dNTPs	<u>d</u> esoxirribonucleótidos <u>T</u> rifosfato
DO	<u>D</u> ensidad <u>Ó</u> ptica
EEM	<u>E</u> rror <u>E</u> stándar de la <u>M</u> edia
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico (" <u>ER-Associated Degradation</u> ")
ERES	Sitios de salida del retículo endoplásmico (" <u>ER Exite Sites</u> ")
ERGIC	Compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el Golgi (" <u>ER-Golgi Intermediate Compartment</u> ")
ERK	Quinasas reguladas extracelularmente (" <u>Extracellular signal- Regulated Kinases</u> ")
ERSE	Elemento respondedor a estrés de RE (" <u>ER Stress Responsive Element</u> ")
Etc.	<u>E</u> tcétera
Fig.	Figura
FL	Longitud completa (" <u>F</u> ull <u>L</u> ength")
FSK	<u>F</u> orskolina
FRAP	Recuperación de la Fluorescencia Después del Fotoblanqueado (" <u>F</u> luorescence <u>R</u> ecery <u>A</u> fter <u>P</u> hotobleaching")

FRTL-5	Línea celular de tiroides de rata Fischer (“ <u>F</u> ischer <u>R</u> at <u>T</u> hyroid cell <u>L</u> ine- <u>5</u> ”)
Gαq	Proteína <u>G</u> subunidad <u>αq</u>
Gαs	Proteína <u>G</u> subunidad <u>αs</u>
GAP	Proteína activadora de GTPasa (“ <u>G</u> TPase <u>A</u> ctivating <u>P</u> rotein”)
GAPDH	<u>G</u> licer <u>a</u> ldehido-3- <u>F</u> osfato <u>D</u> ehidrogenasa
GBF1	Factor específico de Golgi resistente a BFA 1 (“ <u>G</u> olgi-specific <u>B</u> FA resistant <u>F</u> actor <u>1</u> ”)
GCMa	Factor ausente de las células gliales a (“ <u>G</u> lial <u>C</u> ell <u>M</u> issing <u>a</u> ”)
GDP	<u>G</u> uanosín <u>D</u> ifosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos Guanina (“ <u>G</u> uanine-nucleotide <u>E</u> xchange <u>F</u> actor”)
GFP	Proteína Fluorescente Verde (“ <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein”)
GM130	Proteína de matriz de Golgi 130 (“ <u>G</u> olgi <u>M</u> atrix <u>P</u> rotein <u>130</u> ”)
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (“ <u>G</u> <u>P</u> rotein <u>C</u> oupled <u>R</u> eceptor”)
GTP	<u>G</u> uanosín <u>T</u> rifosfato
hCG	<u>H</u> ormona gonadotrofina <u>c</u> oriónica
LB	Medio de cultivo ( <u>L</u> uria <u>B</u> ertani)
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (“ <u>M</u> itogen <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase”)
MOPS	Buffer ácido 3-( <u>N</u> morfolino) <u>p</u> ropanesulfónico
NIS	Simportador de yoduro-sodio (“ <u>N</u> a- <u>I</u> <u>S</u> ymporter”)
pb	<u>P</u> ares de <u>b</u> ases
PBS	Solución salina de fosfatos (“ <u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline”)
PBS-T	<u>PBS</u> suplementado con 0,2% v/v de <u>t</u> wain-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (“ <u>P</u> olimerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction”)
PKA	<u>P</u> roteína quinasa <u>A</u>
PKC	<u>P</u> roteína quinasa <u>C</u>
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real (“ <u>q</u> uantitative <u>R</u> everse <u>T</u> ranscription - <u>PCR</u> ”)
Rab	Proteínas semejantes a Ran en cerebro de rata (“ <u>R</u> as-like in rat <u>B</u> rain”)
RDI	<u>R</u> egión de <u>I</u> nterés
RDR	<u>R</u> egión de <u>R</u> referencia
RE	<u>R</u> etículo <u>E</u> ndoplásmico
REL	<u>R</u> etículo <u>E</u> ndoplásmico <u>L</u> iso
RER	<u>R</u> etículo <u>E</u> ndoplásmico <u>R</u> ugoso
rpm	<u>r</u> evoluciones <u>p</u> or <u>m</u> inuto
S1P	Proteasa del Sitio-1 (“ <u>S</u> ite- <u>1</u> <u>P</u> rotease”)
S2P	Proteasa del Sitio-2 (“ <u>S</u> ite- <u>2</u> <u>P</u> rotease”)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (“ <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate”)
SNARE	“ <u>S</u> oluble <u>N</u> SF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) <u>A</u> ssociation <u>P</u> rotein <u>R</u> eceptor”
SRP	Partícula de reconocimiento de señal (“ <u>S</u> ignal <u>R</u> ecognition <u>P</u> article”)

T <sub>1/2</sub>	Tiempo medio de recuperación de la fluorescencia
TBS	Solución salina de Tris (“ <u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>S</u> aline”)
TBS-T	<u>T</u> BS suplementado con 0,2% de <u>t</u> ween-20
TG	<u>T</u> iroglobulina
TGN	Red trans-Golgi (“ <u>T</u> rans- <u>G</u> olgi <u>N</u> etwork”)
TPO	<u>T</u> iroperoxidasa
TSH	Hormona estimulante de tiroides (“ <u>T</u> hyroid- <u>S</u> timulating <u>H</u> ormone”)
TSHR	Receptor de <u>TSH</u>
TTF1	Factor transcripcional de tiroides 1 (“ <u>T</u> hyroid <u>T</u> ranscription <u>F</u> actor <u>1</u> ”)
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (“ <u>U</u> nfolded <u>P</u> rotein <u>R</u> esponse”)
UPRE	Elemento de respuesta a UPR (“ <u>U</u> nfolded <u>P</u> rotein <u>R</u> esponse <u>E</u> lement”)
VTC	Conglomerado túbulo-vesicular (“ <u>V</u> esicular <u>T</u> ubular <u>C</u> luster”)
YFP	Proteína Fluorescente Amarilla (“ <u>Y</u> ellow <u>E</u> luorescent <u>P</u> rotein”)

# RESUMEN

El transporte intracelular de proteínas es una actividad esencial para las células eucariotas. La vía secretora ejecuta el transporte de proteínas hacia el exterior celular y participa en el transporte de proteínas y lípidos entre los diferentes compartimentos de membrana que integran la vía. La coordinación de las distintas etapas de transporte entre los compartimentos intracelulares es necesaria para permitir el flujo de membranas y mantener el tamaño de las organelas y la homeostasis celular.

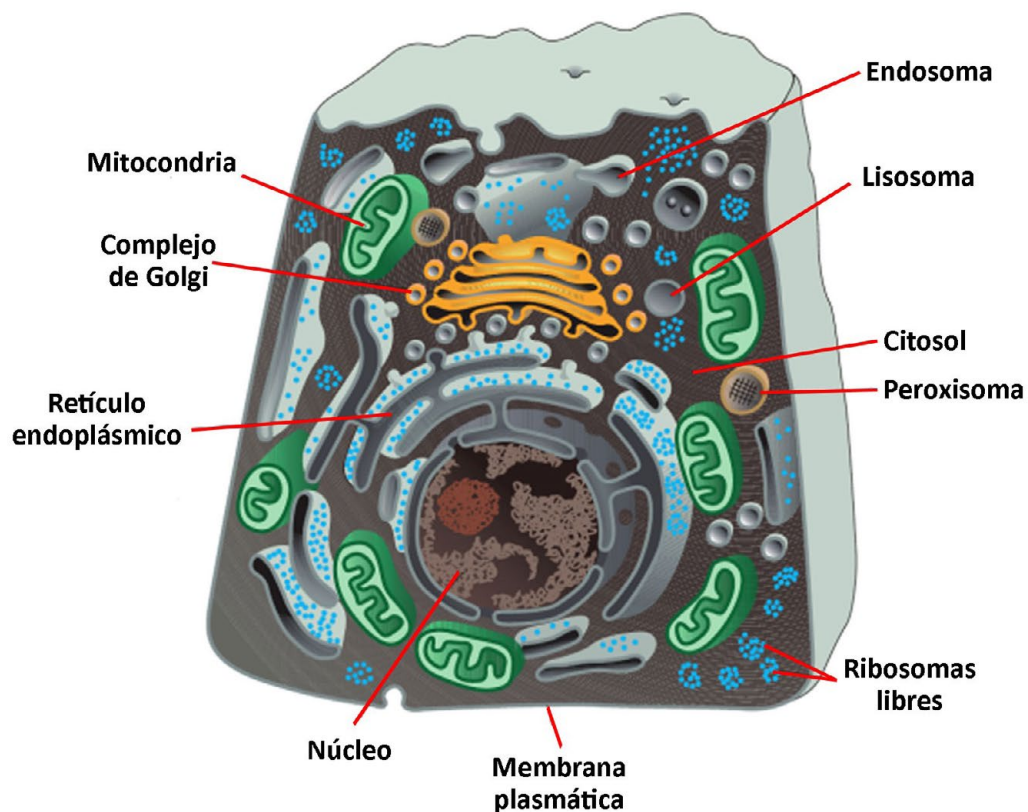
Las proteínas que son transportadas a través de la vía secretora son traslocadas al Retículo Endoplásmico (RE) y, posteriormente, son reclutadas a regiones especializadas del mismo, denominadas sitios de salida del RE (ERES - "ER Exit Sites"). En estos sitios, el complejo proteico de cubierta tipo II (COPII) es el responsable de concentrar y seleccionar el material a ser exportado, y también participa en la deformación de la membrana necesaria para la generación de intermediarios de transporte. Luego, en la interfase de los ERES y el compartimento intermedio entre RE y Golgi (ERGIC o VTCs) se produce el intercambio de COPII por el complejo de cubierta tipo I (COPI), que permite el transporte hacia el complejo de Golgi (anterógrado) o de vuelta al RE (retrógrado). La GTPasa Rab1 es primordial para el transporte anterógrado de proteínas y lípidos desde el Retículo Endoplásmico (RE) al complejo de Golgi, donde interacciona con múltiples efectores que integran la vía secretora. Rab1b participa en el reclutamiento del complejo COPI y la consiguiente maduración de los VTCs. En este trabajo se demostró que Rab1b interacciona con los componentes de COPII Sec23, Sec24 y Sec31, y que la inhibición de Rab1b modifica el fenotipo de COPII. Además, se observó que Rab1b modula la dinámica de asociación/disociación de COPII a membranas en la interfase de los ERES. Nuestros resultados sugieren que Rab1b es un regulador clave de la función y dinámica de asociación/disociación de COPII.

Las vías de transporte intracelular de membranas son ubicuas, pero están diferencialmente desarrolladas en los diversos tejidos dependiendo de su función. Los órganos secretores deben adaptarse a la necesidad creciente de secreción de proteínas que ocurre durante el desarrollo, diferenciación, o cambio de las condiciones fisiológicas. Si bien la maquinaria de transporte que participa en la vía secretora ha sido ampliamente descrita, poco se conoce sobre la regulación de la capacidad secretora en células especializadas. Empleando como modelo secretor y respondedor a un estímulo específico la línea celular derivada de tiroides de rata Fischer, FRTL-5, se demostró que el estímulo con TSH promueve el incremento de los niveles de factores de transporte y del volumen del Golgi. Estos cambios ocurren de manera simultánea con la producción de proteínas importantes en la función tiroidea (carga), sugiriendo que el incremento resultante en la maquinaria de transporte no es consecuencia del incremento de carga. Además, se encontró que gran cantidad de factores de transporte poseen en su región regulatoria un motivo altamente enriquecido, el cual presenta alta homología con la secuencia descrita para el elemento respondedor a AMPc (CRE). Concordantemente, los cambios observados en los factores de transporte son mediados por la vía de la adenilato ciclasa/AMPc. Finalmente se observó que TSH induce la activación y el incremento de los niveles del factor de transcripción CREB3L1, quien promueve el incremento del volumen del complejo de Golgi, incluso en células no estimuladas. En conjunto estos datos indican que, se desencadena una respuesta celular global que le permite a la célula adaptarse al incremento de carga, sugiriendo que vías de señalamiento comunes modulan la producción de genes específicos de tiroides y de la maquinaria de transporte.

# Introducción

# INTR.

Las células eucariotas se caracterizan por poseer un complejo nivel de organización celular ya que poseen un alto grado de compartimentación. Estas células presentan una membrana que las aísla del medio exterior, denominada membrana plasmática, y además contienen un sistema intracelular dinámico de membranas, conocido como sistema de endomembranas, a través del cual organizan espacialmente sus numerosas y diversas funciones. Dicho sistema está compuesto por múltiples estructuras membranosas (organelas), las cuales son funcional y estructuralmente distintas y llevan a cabo sus funciones específicas mediante una gran variedad de proteínas y moléculas características (Rothman, 1994; Elias, 2010). Las principales organelas que integran el sistema de endomembranas son: el Retículo Endoplásmico (RE), el complejo de Golgi y los lisosomas (Fig. 1); las cuales están rodeadas por numerosas vesículas encargadas de comunicar las distintas estructuras (Schatz, 1998; Alberts et al., 2013). El RE constituye una extensión de la membrana nuclear y consiste en un sistema de sacos y tubos interconectados que se extiende por toda la célula. Está compuesto por el RE liso (REL) y el RE rugoso (RER), los cuales están involucrados principalmente en la síntesis de lípidos y proteínas, respectivamente. El RE es el principal



**Figura 1. Principales compartimientos de membrana que integran la célula eucariota.** Estos compartimientos son funcional y estructuralmente distintos entre sí, y están separados del citosol por al menos una membrana selectiva y permeable. Adaptado de Alberts et al., 2013.

sitio de síntesis de nuevas membranas en la célula. El complejo de Golgi está formado por un conjunto de cisternas aplanadas, una red de estructuras túbulo-vesiculares y pequeñas vesículas asociadas. Su función principal es la modificación postraducciona y el transporte de proteínas hacia sus correctas ubicaciones dentro de la célula o hacia el exterior celular. Además, participa en el transporte de lípidos. Los lisosomas son vesículas formadas a partir del complejo de Golgi que poseen enzimas digestivas y se encargan de la degradación de viejas organelas y de macromoléculas y partículas introducidas a la célula por endocitosis. En su camino a los lisosomas, el material endocitado debe pasar primero por una serie de compartimentos denominados endosomas, quienes seleccionan las moléculas y reciclan algunas de ellas de vuelta a la membrana plasmática. Las vesículas constituyen pequeñas unidades de transporte delimitadas que transfieren una gran variedad de moléculas entre distintos compartimientos (Alberts et al., 2013).

Una de las funciones primordiales del sistema de endomembranas es proporcionar un sofisticado mecanismo de transporte por el cual gran parte de las moléculas que se expresan en células de mamífero alcanzan correctamente sus ubicaciones intracelulares o extracelulares (Barlowe y Miller, 2013). El transporte de membranas no sólo es responsable de mediar la secreción de una gran cantidad de proteínas (denominadas proteínas cargo), tales como hormonas, factores de crecimiento, anticuerpos y enzimas, entre otras, sino también es responsable de controlar la forma y composición molecular de cada organela. Para llevar a cabo esta enorme tarea, las organelas que integran el sistema de endomembranas intercambian constantemente sus membranas y proteínas de manera secuencialmente organizada y requieren de mecanismos moleculares subyacentes en el que participan más de 2000 proteínas (Rothman y Wieland, 1996; Barlowe y Miller, 2013). La coordinación de las distintas etapas de transporte entre los compartimentos intracelulares es necesaria para permitir el flujo de membranas y mantener el tamaño de las organelas y la homeostasis celular (Farhan y Rabouille, 2011).

En su mayoría, las proteínas son sintetizadas en ribosomas libres en el citosol o asociados al RE y luego deben trasladarse específicamente a sus ubicaciones correctas, así, algunas proteínas son destinadas a formar parte de las organelas celulares o del citosol, mientras que otras se dirigen a la membrana plasmática o incluso al exterior celular. Su localización final requiere de señales específicas contenidas en su secuencia de aminoácidos, que dirigen su transporte hacia el RE, el núcleo, u otros destinos en la célula o fuera de ella.

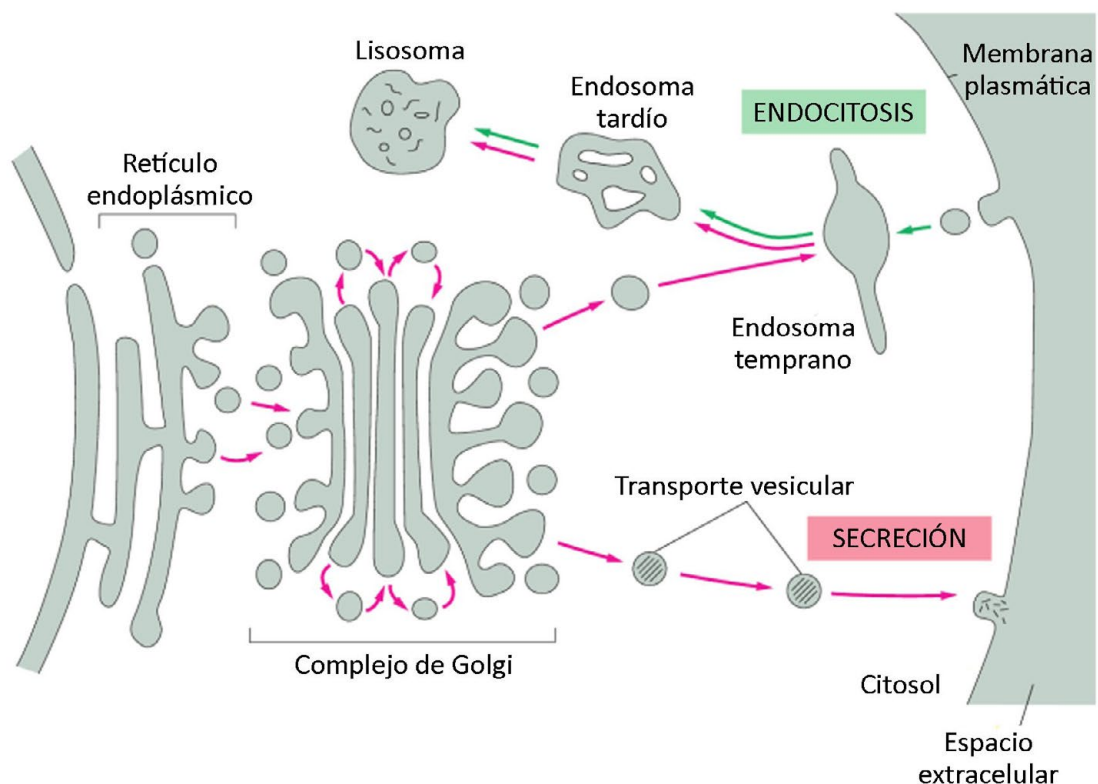
## **Transporte vesicular o de membranas**

El transporte vesicular o de membranas comprende el transporte mediado por estructuras delimitadas por membranas (vesículas y/o túbulos) que emergen de un compartimiento



# INTR.

(dador) y se fusionan con otro (receptor), llevando consigo proteínas transmembrana y moléculas solubles llamadas cargo (Barlowe y Miller, 2013). Es un proceso altamente regulado, en el cual pueden distinguirse dos vías principales: la vía secretora y la vía endocítica/lisosomal (Fig. 2; Park y Lee, 1994; Rothman, 1994). La primera comprende la salida de proteínas recientemente sintetizadas desde el RE al complejo de Golgi y luego a la membrana plasmática, para ser secretadas al espacio extracelular. También, ciertas proteínas utilizan esta vía para trasladarse a sus ubicaciones correctas dentro de la célula (Fig. 2). La segunda vía comprende los intermediarios que provienen de la membrana plasmática hacia el interior celular (lisosomas, endosomas, fagosomas, etc.), proceso denominado endocitosis (Fig. 2), cuya función abarca degradación, señalamiento, reciclado activo, etc. En ambas vías, el flujo general de membranas entre cada compartimiento se encuentra balanceado por un flujo de intermediarios de transporte en la dirección opuesta. Cada intermediario de transporte que emerge de un compartimiento debe ser altamente selectivo, es decir, sólo debe transportar las proteínas apropiadas y debe fusionarse con el compartimiento adecuado. Si bien las vías secretora y endocítica son las más importantes, existen vías alternativas que también permiten el transporte de proteínas y lípidos (Barlowe y Miller, 2013; Scott et al., 2014; Wandinger-Ness y Zerial, 2014).



**Figura 2. Transporte vesicular o de membranas.** Los compartimentos de membrana que integran la célula se comunican entre sí por medio de vesículas de transporte. El transporte vesicular es un proceso altamente regulado, donde pueden distinguirse dos vías muy importantes: la vía secretora (flechas rosas) y la vía endocítica/lisosomal (flechas verdes). Adaptado de Alberts et al., 2013.

Debido a que el presente trabajo se encuentra enfocado en los mecanismos que regulan y brindan especificidad al transporte de proteínas en la vía secretora, a continuación se describen detalladamente las etapas que conforman esta vía.

## **Vía secretora de proteínas**

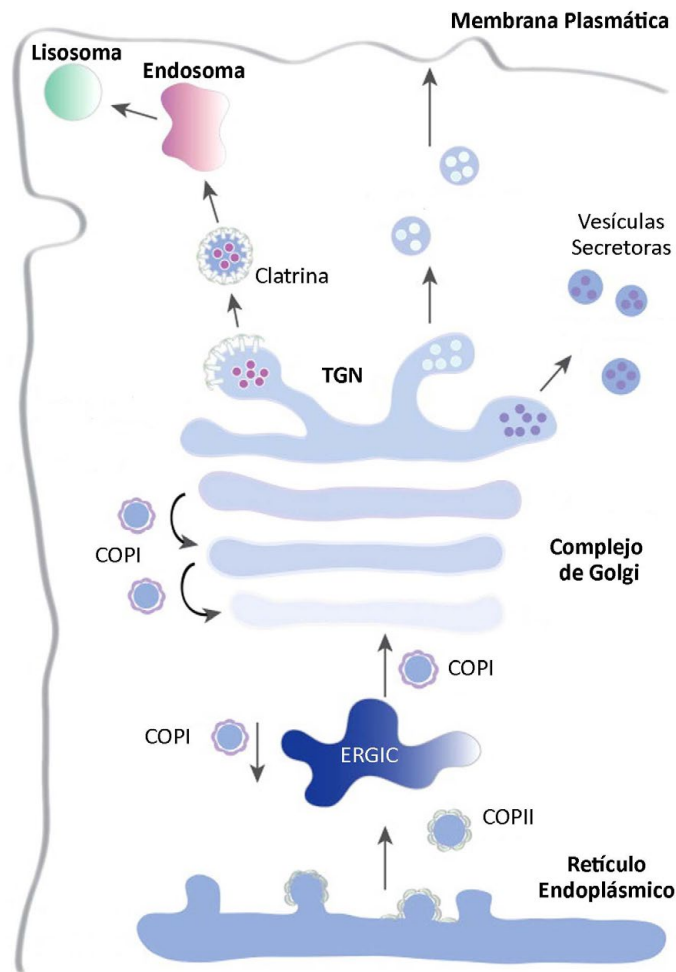
Aproximadamente un tercio del material codificado por los genomas eucariotas es transportado a través de la vía secretora (Dancourt y Barlowe, 2010; Suh y Hutter, 2012). Esta vía comprende el transporte de proteínas recientemente sintetizadas, carbohidratos y lípidos desde el RE al complejo de Golgi, para luego alcanzar sus ubicaciones correctas, ya sea como componentes de la membrana plasmática, de los compartimientos de endomembrana o secretados en el espacio extracelular. Durante la progresión de esta vía las proteínas sobrellevan una serie de modificaciones post-traduccionales tales como plegamiento, glicosilación, formación de puentes di-sulfuro, hidroxilación de residuos prolina, sulfatación de tirosinas, etc., esenciales para su posterior actividad biológica. Además de la correcta modificación de las proteínas, el desafío más grande al que se enfrenta la vía secretora es el de asegurar que el material adecuado se entregue al destino subcelular correcto.

La vía secretora está constituida por organelas estructuralmente distintas, e intermediarios que participan en el intercambio secuencial de proteínas cargo a través de las mismas facilitando así el transporte entre ellas. Entre los compartimientos que integran la vía secretora se encuentran: RE, los sitios de salida del RE (ERES - “ER exit sites”), el compartimiento intermedio entre el RE y el Golgi (ERGIC - “ER-Golgi intermediate compartment”) o conglomerado de vesículas y túbulos (VTCs - “vesicular tubular clusters”), el complejo de Golgi y la red del trans-Golgi (TGN; Fig. 3). Los endosomas se consideran compartimientos de esta vía debido a que participan en el transporte de proteínas cargo en algunos tipos celulares (Ang y Folsch, 2012).

Dentro de esta vía se distinguen cuatro etapas principales: 1) translocación al RE/Control de calidad, 2) transporte RE-Golgi, 3) transporte a través del Golgi y 4) transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática. A continuación se describen dichas etapas.

### **1) Translocación al Retículo Endoplásmico y control de calidad**

Las proteínas que son transportadas a través de la vía secretoria entran al RE y, posteriormente, se trasladan por intermediarios de transporte a través de los diferentes compartimientos que integran la vía hasta alcanzar su destino final (Mandon et al., 2013). La mayoría de las proteínas entra a la vía secretora por un mecanismo denominado translocación co-traducciona (Ng y Walter, 1994; Walter y Johnson, 1994; Nyathi et al., 2013). Estas proteínas contienen señales comunes – un fragmento N-terminal hidrofóbico de



**Figura 3. Vía secretora de proteínas.** Representación esquemática de los distintos compartimientos que integran la vía secretora, donde se indica con flechas el intercambio de material entre los mismos. Además, se muestran las distintas proteínas de cubierta que participan en la vía: COPII, COPI y Clatrina. Adaptado de Kienzle y von Blume, 2014.

aproximadamente 20 aminoácidos (von Heijne, 1983) o el primer dominio transmembrana de una proteína transmembrana (Friedlander y Blobel, 1985) —en su secuencia que las dirigen al RE diferenciándolas de las proteínas citosólicas o de aquellas destinadas a mitocondrias y al núcleo (Blobel y Dobberstein, 1975). Dicha señal es reconocida por el complejo SRP (“Signal Recognition Particle”), lo cual ocurre al comienzo de la traducción y promueve la asociación del ribosoma con las membranas del RE. Las proteínas integrales de membrana son insertadas en las membranas del RE, mientras que las proteínas solubles son translocadas directamente al lumen del mismo (Wild et al., 2004).

En el lumen del RE existen numerosas enzimas encargadas de realizar modificaciones a las proteínas que deben ser exportadas, catalizando principalmente la formación de enlaces disulfuros y el agregado de carbohidratos (Varki, 1998). Además están presentes otras enzimas/chaperonas, tales como Calreticulina y Calnexina, las cuales promueven el

correcto plegamiento y ensamble de las distintas subunidades proteicas (Williams, 2006). Una vez plegadas y ensambladas, las proteínas son sometidas a un control de calidad que previene la acumulación y el transporte de proteínas defectuosas. En células de mamíferos se describieron dos sistemas principales, ellos son el sistema de respuesta a proteínas mal plegadas, UPR (“Unfolded Protein Response”), y el sistema de degradación asociado al RE, ERAD (“ER-Associated Degradation”; Friedlander et al., 2000; Travers et al., 2000). Estos sistemas detectan proteínas agregadas y las translocan nuevamente al citosol para su posterior degradación.

## 2) Transporte entre Retículo Endoplásmico y complejo de Golgi

Una vez que las proteínas pasan el control de calidad del RE, son reclutadas a regiones específicas del RE libres de ribosomas: ERES. En estos sitios, el complejo proteico de cubierta tipo II (COPII) es el responsable de concentrar y seleccionar el material a ser exportado y también participa en la deformación de la membrana necesaria para la generación de intermediarios de transporte (vesículas y/o túbulos) a partir de las membranas del RE (Fig. 3 y 4; Bonifacino y Lippincott-Schwartz 2003). Posteriormente, los intermediarios de transporte con cubierta COPII se fusionan a un sub-compartimento denominado ERGIC o VTCs (Bonifacino y Lippincott-Schwartz 2003; Brandizzi y Barlowe, 2013), donde se selecciona el cargo que debe continuar su camino hacia el Golgi y el que debe volver al RE. En la interfase de los ERES y el ERGIC se produce el intercambio de COPII por el complejo de cubierta tipo I (COPI; Fig. 3 y 5). La adquisición de la cubierta COPI permite, por un lado, el transporte vesicular desde el ERGIC hacia el complejo de Golgi (transporte anterógrado) y, por otro lado, el transporte de moléculas residentes del RE que deben ser recicladas al mismo desde el ERGIC o el Golgi (transporte retrógrado; Scales et al., 1997; Bonifacino y Glick, 2004; Cottam y Ungar, 2012).

## 3) Transporte a través del complejo de Golgi

El complejo de Golgi se localiza en la zona próxima al centro organizador de microtúbulos y la envoltura nuclear. Está constituido por un conjunto de cisternas aplanadas (entre 3 y 8, dependiendo del tipo celular), una red de estructuras túbulo-vesiculares y pequeñas vesículas asociadas. Las cisternas, clasificadas en cis, medial y trans, poseen diferencias en su composición proteica, conteniendo enzimas necesarias para la modificación post-traduccional de las proteínas cargo que por allí transitan (Altan-Bonnet et al., 2004). Luego de la fusión de los intermediarios de transporte provenientes del ERGIC con las membranas cis del Golgi, previa disociación de la cubierta COPI, el cargo es transportado a través de las cisternas del Golgi por un modelo que aún se encuentra en discusión: una población de vesículas recubiertas con COPI mediaría el transporte rápido del cargo entre cisternas, una segunda población de vesículas COPI mediaría el reciclado de material hacia el RE y

las moléculas de gran tamaño serían transportadas con las cisternas, a medida que estas maduran, en un mecanismo independiente de la acción de vesículas COPI (Mironov et al., 2005; Patterson et al., 2008). Finalmente, el cargo es exportado por una red túbulo-vesicular conocida como TGN (Mironov et al., 2005).

#### 4) Transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática

En el TGN las proteínas cargo son clasificadas y, posteriormente, empaquetadas en distintos tipos de vesículas, algunas de ellas recubiertas por el complejo de cubierta Clatrina, que permite que las proteínas sean transportadas hasta su destino final (Fig. 3; Mellman y Simons, 1992; Rodríguez-Boulan y Musch, 2005).

### **Factores que regulan el transporte de membranas en la vía secretora**

En general, las etapas del transporte intracelular de membranas en la vía secretora incluyen la formación de un intermediario de transporte a partir de una membrana dadora, su movilización y posterior fusión con una membrana receptora. Existen una gran cantidad de factores que controlan estas etapas, entre ellos se encuentran: 1) Proteínas de cubierta; 2) Factores de reconocimiento/anclaje; 3) Factores de fusión; 4) Proteínas G con actividad GTPasa (Rabs, Arfs, etc).

#### 1) Proteínas de cubierta

El transporte intracelular entre los compartimentos que integran la vía secretora comprende la formación de vesículas o intermediarios de transporte iniciada por proteínas citoplasmáticas que son reclutadas sobre las membranas y participan en procesos de selección y concentración de material cargo y en la deformación (curvatura) de la membrana (Lee y Miller, 2007; Sato y Nakano, 2007). Se han caracterizado distintas proteínas de cubierta que se encuentran evolutivamente conservadas en las células eucariotas, desde levaduras a mamíferos, siendo las principales el complejo COPII, COPI y Clatrina. Estas cubiertas difieren en su composición y en su lugar de acción (Fig. 3), no obstante comparten determinadas características. Todas son reclutadas a la membrana por pequeñas proteínas G con actividad GTPasa, además, todas ellas se disocian, por un mecanismo dependiente de la hidrólisis de GTP, previo al reconocimiento y fusión con el compartimento adecuado (Rothman, 1996; Schekman y Orci, 1996). A continuación se describen detalladamente las características más importantes de las proteínas de cubierta que participan en la primera etapa de la vía secretora (transporte entre el RE y el complejo de Golgi), ya que nuestro interés está enfocado en los factores y mecanismos que regulan dicha etapa.



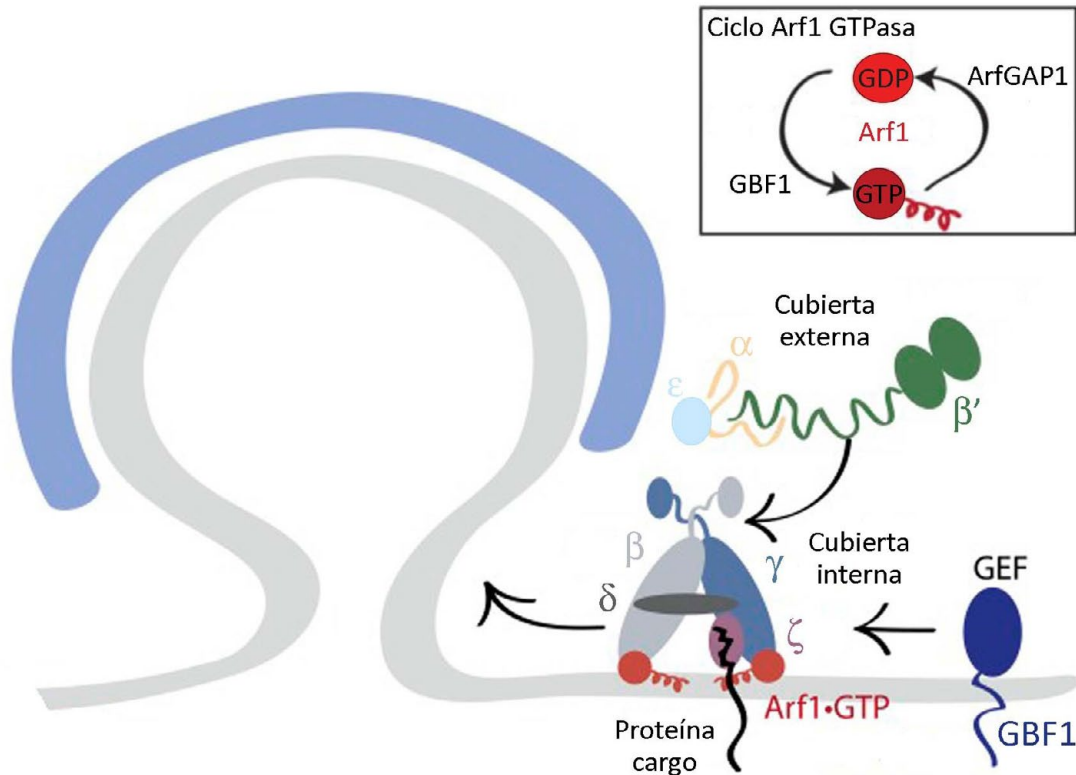
en la vesícula naciente (Kuehn et al., 1998; Miller et al., 2002; Mossessova et al., 2003), mientras que Sec23 es una proteína activadora de GTPasa (GAP) que estimula la actividad enzimática de Sar1 (Yoshihisa et al., 1993). Una vez concluida esta etapa, el complejo recluta al hetero-dímero Sec13/Sec31, el cual forma una capa externa que estabiliza al complejo. La interacción secuencial entre las diferentes subunidades de COPII da lugar a la polimerización de la cubierta, promoviendo la curvatura de las membranas del RE y la progresión del cargo en la vía secretora. Finalmente, la hidrólisis de GTP en Sar1 promueve la disociación de la cubierta.

En los últimos años se ha descrito que la biogénesis, el mantenimiento y la regulación de los ERES y su habilidad para la formación de la cubierta COPII depende de la proteína Sec16 (Connerly et al., 2005; Watson et al., 2006; Hughes et al., 2009) ya que establece una plataforma en los ERES que recluta y estabiliza a COPII a través de múltiples interacciones con todas las subunidades de la cubierta (Fig. 4; Hughes et al., 2009; Barlowe y Miller, 2013).

## Proteínas de cubierta COPI

El complejo COPI posee múltiples sitios de acción en diferentes etapas de la vía secretoria, incluyendo el transporte anterógrado y retrógrado en la interfase RE-Golgi mediante intermediarios que se originan en los VTCs y el transporte a través del Golgi (anterógrado y retrógrado; Beck et al., 2009). Además, las vesículas COPI están involucradas en el mantenimiento estructural y funcional del complejo de Golgi (Bethune et al., 2006).

La cubierta COPI está formada por siete subunidades proteicas (coatómeros), denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ -COP y la proteína con actividad GTPasa Arf1 ("ADP ribosylation factor 1"; Malhotra et al., 1989; Waters et al., 1991). El complejo heptamérico se encuentra total o parcialmente ensamblado en el citosol y se une a membranas cuando es reclutado por Arf1 (Hara-Kuge et al., 1994; Yu et al., 2012), lo que origina la deformación y gemación de la membrana (Orci et al., 1993; Zhao et al., 1997). Para que esto ocurra es necesaria la activación de la GTPasa Arf1, promovida por el intercambio de GDP/ GTP (Donaldson et al., 1992; Helms y Rothman, 1992), mediado por diferentes proteínas GEF dependiendo de la etapa de transporte en la cual el proceso esté ocurriendo. Finalmente, una proteína GAP específica induce la hidrólisis de GTP unido a Arf1, promoviendo la disociación de la cubierta (Fig. 5; Lee et al., 2004; Luo y Randazzo, 2008; Szul y Sztul, 2011; Shiba y Randazzo, 2012). Se han caracterizado una gran variedad de GEFs y GAPs para Arf1 a lo largo de las distintas etapas del transporte (D'Souza-Schorey y Chavrier, 2006). Particularmente, en la interfase RE-Golgi el GEF de Arf1 es GBF1 (factor específico de Golgi resistente a Brefeldin A (BFA) 1) y la GAP es ArfGAP1, las cuales se localiza en las membranas del ERGIC y del cis-Golgi, promoviendo la progresión de los intermediarios de transporte provenientes del RE (Kawamoto et al., 2002; Garcia-Mata et al., 2003).



**Figura 5. Formación de la cubierta COPI.** La cubierta COPI está compuesta por la GTPasa Arf1 y un complejo proteico de 7 subunidades que se encuentra previamente ensamblado en el citosol ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\beta'$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ - y  $\zeta$ -COP). Arf1 se activa por la acción de GBF1, y se asocia a membrana. Así, Arf1-GTP promueve el reclutamiento del complejo COPI y la formación de vesículas desde el ERGIC, que poseen distintas proteínas según su destino. El ciclo GTPasa de Arf1 (recuadro negro) es controlado por la GEF GBF1 y la GAP ArfGAP1, que son específicas de la interfase RE-Golgi. Adaptado de Barlowe y Miller, 2013.

## 2) Factores de reconocimiento/anclaje

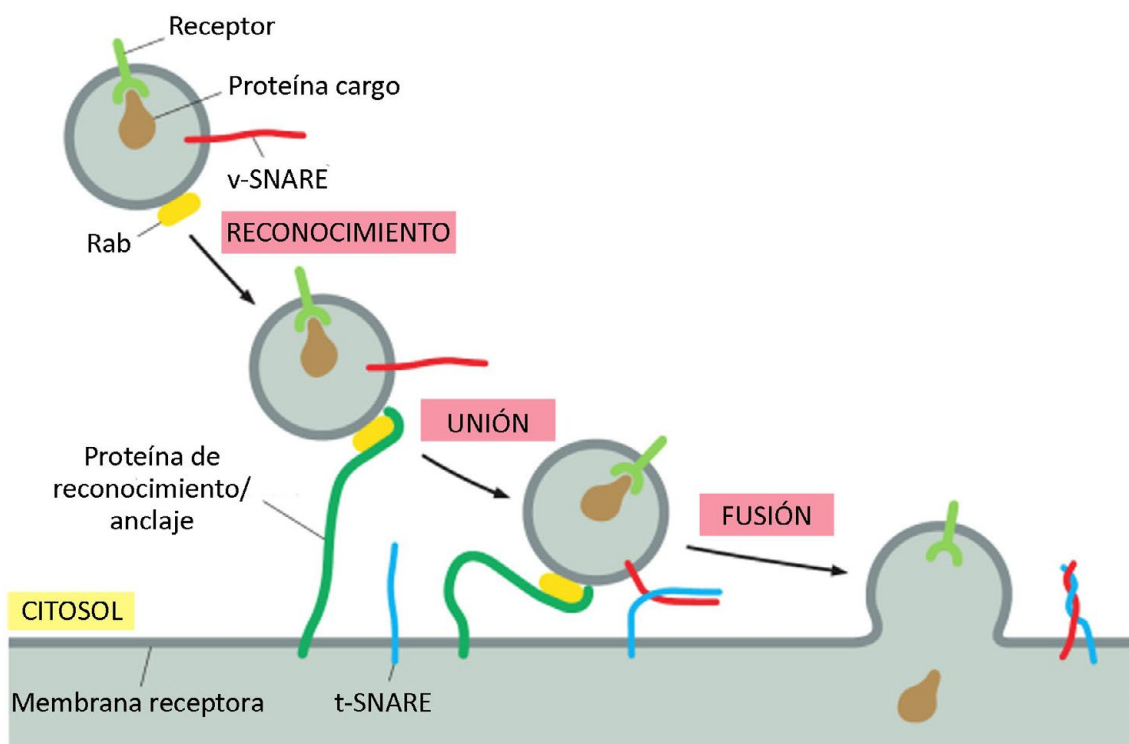
A medida que ocurre el transporte de membranas, los intermediarios deben ser direccionados, acercados y unidos a la membrana receptora antes de su fusión (Jackson et al., 2012). El enlace o primer contacto del intermediario de transporte con la membrana de destino se encuentra mediado por los factores de reconocimiento y anclaje (Sztul y Lupashin, 2009). Éstos son proteínas o complejos de proteínas que se encuentran tanto en las membranas de los intermediarios de transporte como en las membranas del compartimento receptor. El reconocimiento específico del factor de anclaje de una vesícula por el de una membrana receptora lleva al acercamiento de ambas estructuras, permitiendo la acción de factores involucrados en procesos de fusión (Fig. 6).

Los principales factores de reconocimiento/anclaje que participan en la primera etapa de la vía secretora son las proteínas p115, GM130 y Giantina (Nakamura et al., 1995; Seemann



# INTR.

et al., 2000). Estas proteínas forman parte del Golgi, siendo p115 y GM130 proteínas de la matriz del Golgi y Giantina, transmembrana, y son encargadas del mantenimiento estructural de dicha organela. p115 puede interactuar tanto con GM130 como con Giantina. p115 se asocia a las membranas de vesículas o intermediarios de transporte derivados del compartimento intermedio, mediante la interacción con la GTPasa Rab1b (Allan et al., 2000; Guo y Linstedt, 2014), mientras que GM130 y Giantina se limitan a las membranas del Golgi. La interacción de p115 con GM130 y Giantina promueve el acercamiento de vesículas COPII o COPI con las membranas del cis-Golgi (Allan et al., 2000; Whyte y Munro, 2002; Guo et al., 2008). Este proceso brinda especificidad a la unión de la vesícula con la membrana receptora y promueve su fusión, ya que p115 también posee la capacidad de modular la función de proteínas SNAREs (Sonnichsen et al., 1998; Linstedt et al., 2000; Hong, 2005; Diao et al., 2008). Otros factores de reconocimiento y anclaje que están presentes en el Golgi se encuentran en el TGN y median el reconocimiento específico de intermediarios de transporte provenientes de la vía endocítica/reciclado con el complejo de Golgi. Entre ellos se puede destacar la proteína Golgin97 (Lu et al., 2004).



**Figura 6. Reconocimiento y fusión de membranas.** Proteínas presentes en los intermediarios de transporte, conocidas como factores de reconocimiento o anclaje, reconocen específicamente a aquellas que se encuentran en la membrana receptora. Esta interacción permite a las vesículas aproximarse y unirse específicamente a sus membranas blanco apropiadas. Luego del acercamiento, la acción de factores de fusión promueve la fusión de las membranas en cuestión. Adaptado de Alberts et al., 2013.

### 3) Factores de fusión

Luego del reconocimiento entre el intermediario de transporte y el compartimiento receptor mediado por los factores de anclaje se lleva a cabo el proceso de fusión de membranas, que permite la progresión del cargo en la vía secretoria. En esta etapa participan un gran número de factores, entre ellos los más importantes son las proteínas integrales de membrana SNARES (“Soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) Association Protein Receptor”), que se encuentran tanto en las membranas de las vesículas o intermediarios de transporte (denominados v-SNARES, por vesículas) como en las membranas del compartimiento receptor (denominados t-SNARES, por “target” – blanco; Bonifacino y Glick, 2004). Una vez que la vesícula y la membrana receptora se encuentran lo suficientemente cercanas, por acción de los factores de anclaje, los dominios N-terminales expuestos al citosol de v-SNARES y t-SNARES interaccionan. Esta interacción promueve el entrelazamiento de ambas proteínas y el acercamiento y fusión de ambos compartimientos (Fig. 6).

### 4) Proteínas G con actividad GTPasa

La superfamilia de pequeñas proteínas G con actividad GTPasa, conocida también como RAS GTPasas, comprende un gran número de proteínas involucradas en diversas funciones celulares tales como división celular, diferenciación, transporte vesicular, control del citoesqueleto, señalización intracelular, etc (Goitre et al., 2014). Todas responden a un mecanismo general de acción basado en su capacidad de ciclar de una forma unida a GDP, inactiva, a una forma unida a GTP, activa, desde el citosol a las membranas. El intercambio de GDP por GTP es mediado por proteínas GEFs y la hidrólisis de GTP es promovida por la acción de proteínas GAPs, que estimulan su actividad hidrolasa intrínseca (Bos et al., 2007). De acuerdo a su estructura, secuencia y función, los miembros de esta superfamilia se clasifican en sub familias, siendo las más estudiadas las GTPasas Ras, Rho, Rab, Rac, Arf y Ran. De todas ellas, las GTPasas Arf y Rab poseen un rol fundamental en la regulación del transporte intracelular de proteínas ya que regulan una gran variedad de procesos incluyendo la formación de vesículas y su desplazamiento a lo largo de elementos del citoesqueleto, unión y fusión de intermediarios de transporte con sus membrana receptoras mediante el reclutamiento de efectores específicos, entre otros (Balch, 1990; Goud et al., 1990; Donaldson et al., 1992; Schwaninger et al., 1992; Brown et al., 1993; de Leeuw et al., 1998; Der y Balch, 2000; Pfeffer, 2001; Bhuin y Roy, 2014).

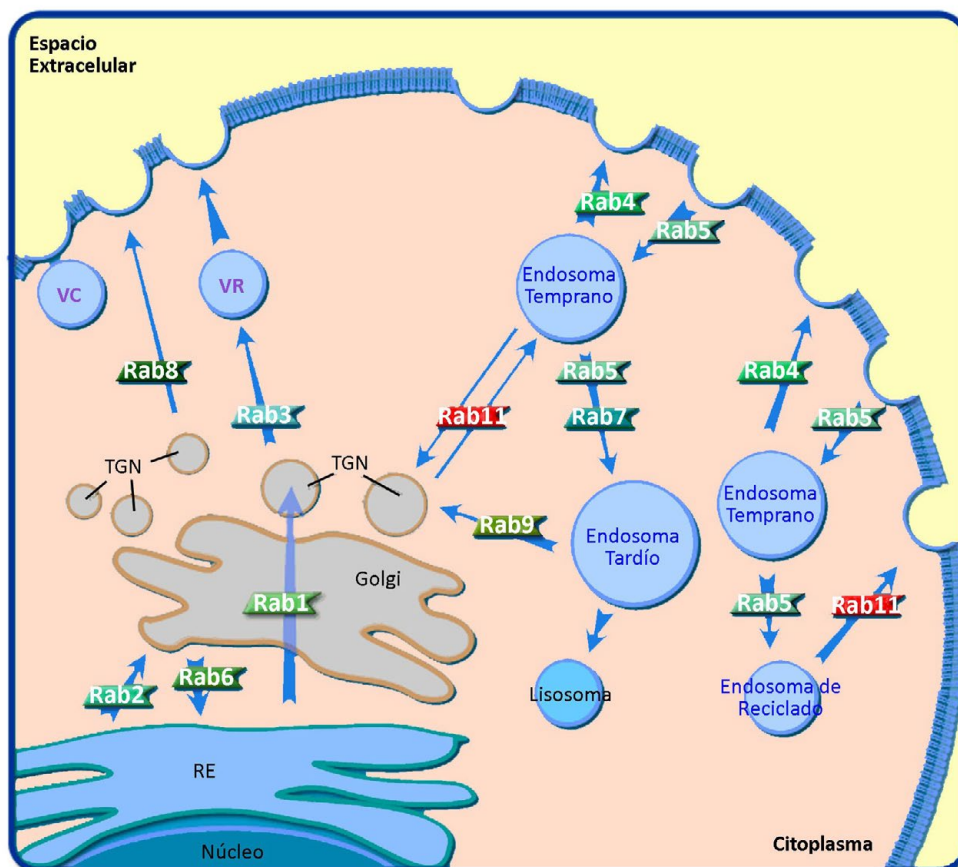
En células eucariotas, las Arf GTPasas poseen un rol central en el transporte intracelular de lípidos y enzimas. La activación de las Arfs lleva al reclutamiento de proteínas de cubierta y de enzimas modificadoras de lípidos que a su vez regulan el reclutamiento de cargo y la deformación de las membranas asociadas a una etapa de transporte determinada (Nie et al., 2003). Particularmente, en la primera etapa de la vía secretora se destaca a Arf1, cuya

función radica en el reclutamiento del complejo de cubierta COPI, evento que se describió anteriormente.

Por otro lado, las Rab GTPasas comprenden una de las mayores sub familias de proteínas G en células eucariotas. Debido a que parte del presente trabajo se encuentra enfocado en el estudio de la GTPasa Rab1, la descripción de esta familia se realizará más detalladamente.

## Rabs GTPasas

Un grupo fundamental de proteínas que participa y coordina las diferentes etapas de la vía secretora mediante numerosos mecanismos moleculares que aseguran la eficiencia del transporte es el integrado por la familia de las Rabs GTPasas. En células humanas se han caracterizado más de 60 Rabs, cada una de las cuales exhibe un patrón de localización subcelular distinto (Fig. 7; Zerial y McBride, 2001; Pfeffer y Aivazian, 2004) y participan específicamente en diferentes etapas de las vías endocítica/lisosomal y exocítica interaccionando con una gran variedad de proteínas denominadas efectores. Si bien la



**Figura 7. Localización subcelular de las Rab GTPasas.** Representación esquemática de algunas de las proteínas pertenecientes a esta familia (en mamíferos se han descrito más de 60), las cuales regulan distintas vías y etapas del transporte vesicular. Particularmente la proteína Rab1 se localiza en la interfase RE-Golgi. VC: Vesículas de transporte constitutivo. VR: Vesícula de transporte regulado. Adaptado de Biocarta ([http://www.biocarta.com/pathfiles/h\\_rabpathway.asp](http://www.biocarta.com/pathfiles/h_rabpathway.asp)).

mayoría de las proteínas Rab son de expresión ubicua, algunas se expresan específicamente en un determinado tejido, como por ejemplo Rab3A que se expresa fundamentalmente en cerebro (Gurkan et al., 2005). Las Rabs GTPasas son fundamentales para el correcto funcionamiento de las organelas conectadas por transporte vesicular dado que controlan la fidelidad de la fusión de las vesículas con la membrana receptora. La especificidad de unión de una proteína Rab a una membrana determinada está dada por un conjunto de factores entre los cuales se encuentran: las secuencias de sus dominios C-terminales; los factores GEFs y GAPs; y sus distintas proteínas efectoras (Collins, 2003; Pfeffer y Aivazian, 2004; Seabra y Wasmeier, 2004; Mizuno-Yamasaki et al., 2012).

## **Rab1b en la interfase RE-Golgi**

Particularmente, la GTPasa Rab1 es esencial para la coordinación de la primera etapa de la vía secretoria, regulando el transporte y fusión de membranas en la interfase RE-Golgi (Fig. 7; Schwaninger et al., 1992; Alvarez C, 2003; Monetta P, 2007). Hasta el momento se han caracterizado dos isoformas de Rab1, Rab1a y Rab1b (Touchot et al., 1987). Ambas regulan el transporte de proteínas en la interfase RE-Golgi (Schwaninger et al., 1992). Si bien se ha demostrado que sus funciones podrían ser intercambiables (Nuoffer et al., 1994), ya que poseen un 92% de homología en sus secuencias de aminoácidos (Touchot et al., 1987), recientemente se describió que Rab1a, y no Rab1b, también participa en la vía endocítica regulando la selección de múltiples proteínas cargo en endosomas tempranos (Mukhopadhyay et al., 2014).

Se han identificado un gran número de efectores de Rab1, entre los cuales se destacan p115 (Allan et al., 2000), GM130 (Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001), Golgin84 (Satoh et al., 2003), MICAL-1 (Weide et al., 2003), Iporin (Bayer et al., 2005) y Giantina (Beard et al., 2005). p115, GM130 y Giantina son proteínas involucradas en etapas de reconocimiento y fusión de membranas entre RE y Golgi. p115 se encuentra asociada a las membranas de los intermediarios de transporte, GM130 se asocia mediante su interacción con GRASP65 a las membranas del cis-Golgi. Giantina, es una proteína transmembrana de Golgi. Se ha propuesto que la interacción de Rab1 con estas proteínas podría tener muchas funciones, por un lado Rab1 con p115 sería la responsable de la unión de p115 a las membranas de los intermediarios de transporte con cubierta COPII, programándolos así para la fusión con las membranas del cis-Golgi (Allan et al., 2000). Además, se ha propuesto que la unión de Rab1 a estas tres proteínas generaría cambios conformacionales que favorecerían la interacción de sus extremos C-terminales, promoviendo así el proceso de fusión heterotípica entre vesículas y la membrana receptora (Beard et al., 2005). Golgin84 es una proteína estructural del complejo de Golgi y la interacción con Rab1 podría tener un rol en el mantenimiento

# INTR.

de la arquitectura de este complejo (Sato et al., 2003). MICAL-1 es una proteína citosólica que interacciona con el citoesqueleto celular y su interacción con Rab1 podría tener como función el anclaje del complejo de Golgi a los filamentos intermedios del citoesqueleto (Weide et al., 2003). Iporin es una proteína citosólica que podría estar involucrada en vías de señalización y se ha sugerido que su interacción con Rab1 relacionaría el direccionamiento de los intermediarios de transporte con vías de señalización (Bayer et al., 2005).

Además, resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo revelaron que Rab1b interacciona con GFB1, reclutándola a las membranas de los VTCs (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). Es decir, la asociación de GBF1 a membranas es dependiente de Rab1b. A su vez, GBF1 activa a Arf1 promoviendo la formación del complejo COPI y la consiguiente maduración de los VTCs (Donaldson et al., 1992; Helms y Rothman, 1992). Por lo tanto Rab1b, es esencial para la formación de COPI. De esta manera, Rab1b estaría participando en eventos previos al reconocimiento/anclaje de membranas, proceso en el que su función ha sido mayormente caracterizada.

Asimismo, en levaduras se describió que un integrante del complejo COPII, Sec23, interacciona con un complejo de proteínas denominado TRAPPI, el cual actúa como GEF del homólogo de Rab1, Ypt1, promoviendo su activación en vesículas COPII y el subsiguiente reclutamiento de diferentes efectores necesarios para el reconocimiento y la fusión de estas vesículas con las membranas del Golgi (Jones et al., 2000; Wang et al., 2000; Sacher et al., 2001; Cai et al., 2008). En mamíferos, la subunidad Sec23 del complejo COPII recluta al complejo TRAPPII, el cual posee actividad GEF sobre Rab1, promoviendo así la formación de los VTCs (Yu et al., 2006; Barrowman et al., 2010). Sin embargo, en células de mamíferos se desconoce si Rab1b interacciona con componentes de COPII o si participa en la regulación de la función de este complejo de cubierta. El primer objetivo del presente trabajo es analizar el rol de Rab1b en la dinámica y función de COPII en células de mamíferos, partiendo de la siguiente hipótesis:

## Hipótesis I

Las proteínas Rabs regulan el transporte vesicular participando en procesos de formación, reconocimiento/anclaje, unión y fusión de vesículas mediante la interacción con sus efectores (Hutagalung y Novick, 2011). Ha sido ampliamente descrito el rol de Rab1 en la regulación del reconocimiento/anclaje de los intermediarios de transporte con sus membranas receptoras, mediante la interacción con sus efectores p115 (Allan et al., 2000), GM130 (Weide et al., 2001; Moyer et al., 2001) y Golgin84 (Satoh et al., 2003). Sin embargo, el papel de Rab1 en la formación/función de complejos de cubierta es menos reconocido. A partir de que I) Rab1b participa en la asociación de GBF1 a las membranas de los VTCs, proteína necesaria para el reclutamiento del complejo COPI y la consiguiente maduración de los VTCs (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007); y que II) en levaduras el integrante del complejo COPII, Sec23, interacciona con el GEF del homólogo de Rab1, Ypt1, promoviendo así la activación de esta GTPasa en vesículas COPII y el consecuente reclutamiento de diferentes efectores necesarios para el reconocimiento y la fusión de estas vesículas con las membranas del Golgi (Jones et al., 2000; Wang et al., 2000; Sacher et al., 2001; Cai et al., 2008), es que proponemos que Rab1b también participa en la regulación de la función de COPII en células de mamífero.

## Coordinación del transporte de membranas

Como otras funciones celulares, el transporte intracelular de membranas requiere de la coordinación de una serie de organelas y componentes, con el propósito de asegurar la correcta incorporación de las proteínas sintetizadas al RE, la modificación postraduccional de las mismas y el transporte a sus destinos finales apropiados. Además, el flujo de membranas a través de los compartimentos que integran la vía debe adaptarse a los requerimientos celulares y responder a señales extracelulares. Muchos de los mecanismos moleculares que subyacen a los eventos de transporte elementales (como la deformación de las membranas para formar intermediarios de transporte, su escisión, fusión, etc.) han sido descritos con gran detalle. Aún resta terminar de comprender acerca de los aspectos globales de la organización y regulación del tráfico de membranas de las vías secretora y endocítica en células eucariotas.

La vía secretora y el complejo de Golgi son regulados por sistemas de control para garantizar la homeostasis y su óptimo funcionamiento en todas las condiciones, incluso bajo perturbaciones internas y externas. El sistema de control molecular que regula los flujos de transporte entre el RE y el Golgi para mantener el equilibrio entre estas dos organelas es el mediado por el receptor KDEL (KDELRL). Esta proteína localizada en el Golgi activa una cascada de señalización que resulta en la fosforilación de proteínas de la maquinaria de transporte. Esto induce el transporte retrógrado hacia el RE, promoviendo el balance del flujo entre el RE y el Golgi. Al mismo tiempo, KDELRL activa cascadas de señalización que aceleran el transporte anterógrado a través del Golgi y desde este hacia la membrana plasmática. Además, KDELRL activa factores de transcripción que regulan la expresión de genes relacionados al transporte. Así, el rol principal de este sistema de control es mantener el balance de flujo de membranas y proteínas desde y hacia el Golgi, para conservar el tamaño y la composición adecuada de las organelas involucradas, manteniendo la homeostasis a través de procesos transcripcionales y de señalización (Giannotta et al., 2012; Luini et al., 2014; Cancino et al., 2014). Estas vías de señalización posicionan al complejo de Golgi como un regulador central del señalamiento celular.

A pesar de la identificación y caracterización del señalamiento por KDELRL, aún se desconoce los mecanismos que explican la adaptación celular a variaciones en las condiciones fisiológicas. En la vía secretora, el complejo de Golgi posee una participación muy importante, procesando proteínas y lípidos, realizando selección o “sorting” de proteínas, participando como plataforma de señalamiento y apoyando el crecimiento y la composición de la membrana plasmática (Wilson et al., 2011). El tamaño del complejo de Golgi estaría regulado para cumplir con las demandas de cada función y esto involucraría cambios variados en sus diferentes subdominios. Existen evidencias que sustentan la

hipótesis que al tamaño del complejo de Golgi lo determina la abundancia de cargo que, mediante la unión a proteínas de cubierta, conduce a la formación de vesículas para alterar el influjo y eflujo del complejo de Golgi (Guo y Linstedt, 2006). A pesar de la importancia que posee comprender los mecanismos que controlan el tamaño del complejo de Golgi y otras organelas de la vía secretora y la regulación de la expresión de sus componentes, poco se conoce al respecto.

En el caso del RE está ampliamente estudiado su adaptación y regulación de la expresión de las proteínas que lo componen en respuesta a estrés, en donde participa la vía de respuesta a proteínas no plegadas (UPR) que se describe a continuación.

## **Respuesta a proteínas no plegadas (UPR)**

Como punto de entrada a la vía secretora, el RE es responsable del correcto procesamiento y plegamiento de las proteínas a ser transportadas, por lo que debe asegurar que proteínas mal plegadas no procedan a la siguiente etapa de transporte (Zhang y Kaufman 2004). La exposición del RE a condiciones de depleción de glucosa o nutrientes, expresión de proteínas mutantes o mal plegadas, cambios en la homeostasis del calcio, o hipoxia lleva a la acumulación de proteínas no plegadas (Pahl, 1999). Dichas perturbaciones se conocen como estrés de RE. Para compensar esto y mantener su correcto funcionamiento, el RE activa una red de vías de señalización que colectivamente se la conoce como “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR; Lee, 1992; Hampton, 2000; Kohno, 2007). Esta vía establece un balance de la carga de proteínas entrantes con la capacidad de plegado del RE y le permite a las células adaptarse a las situaciones que perturban este equilibrio. A pesar de que muchas veces el estrés de RE surge de situaciones patológicas, la UPR juega un rol central en el desarrollo normal y correcto funcionamiento de células especializadas en secreción. Muchos aspectos de esta respuesta son ampliamente conservados entre eucariotas. La mayoría de los organismos emplean un conjunto de proteínas transmembrana de RE que, mediante señales dirigidas al núcleo, inducen el aumento de transcripción de genes involucrados en funciones del RE, que incrementan la capacidad de plegado de proteínas. Además, se reduce la traducción de nuevas proteínas y aumenta la degradación de proteínas mal plegadas (Kohno, 2007; Moore y Hollien, 2012). Si todo esto falla, la UPR activa apoptosis (Shore et al., 2011)

La UPR comprende tres vías paralelas, conocidas como vías canónicas, donde la activación de cada una de ellas depende de un intermediario específico (proteína censora de estrés), los cuales son IRE1, PERK y ATF6 (Ron y Walter, 2007; Gardner et al., 2013). En cada caso, una proteína integral de membrana, la chaperona GRP78/BiP1, censa el estado de plegamiento de las proteínas en el lumen del RE y transmite esta información al citosol

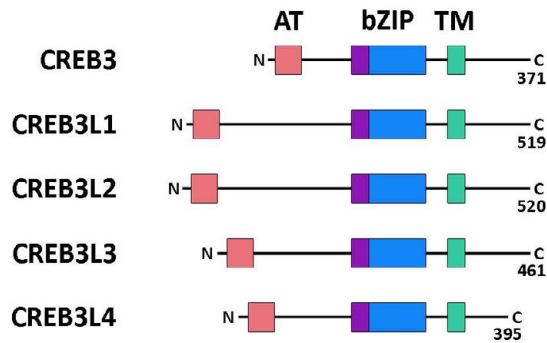


a través de las membranas del RE (Liu et al., 2000; Okamura et al., 2000; Shen et al., 2005). En ausencia de estrés, los intermediarios están unidos a BiP1, encontrándose en un estado inactivo en las membranas del RE. Una sobrecarga de proteínas mal plegadas desplaza a BiP, lo que conlleva a la activación de los reguladores de UPR y sus respectivos efectores con el objetivo de recuperar el funcionamiento normal de la célula deteniendo la traducción de proteínas e incrementando la producción de chaperonas y lípidos involucrados en el plegamiento de proteínas, así como también otros componentes de la maquinaria de secreción (Kohno, 2007; Moore y Hollien, 2012; Fox y Andrew, 2015).

La mayoría de los estudios realizados para comprender la regulación de la vía de UPR se llevaron a cabo utilizando fuertes drogas inductoras de estrés. En la actualidad existe numerosa evidencia que implica a la vía de UPR en la regulación de importantes procesos fisiológicos, tales como metabolismo de lípidos, homeostasis de la glucosa, inmunidad innata, diferenciación celular y secreción (Rutkowski y Ramanujan, 2010; Dufey et al., 2014), los cuales son independientes de una respuesta a estrés. Consecuentemente, la señalización mediada por la vía de UPR se activa con estímulos fisiológicos que requieren ajustar la funcionalidad del RE en respuesta a cambios en la demanda celular, sin la necesidad de que se haya excedido la capacidad de procesamiento de proteínas del RE (Rutkowski y Ramanujan, 2010; Dufey et al., 2014).

## **Factores de transcripción de la familia CREB3**

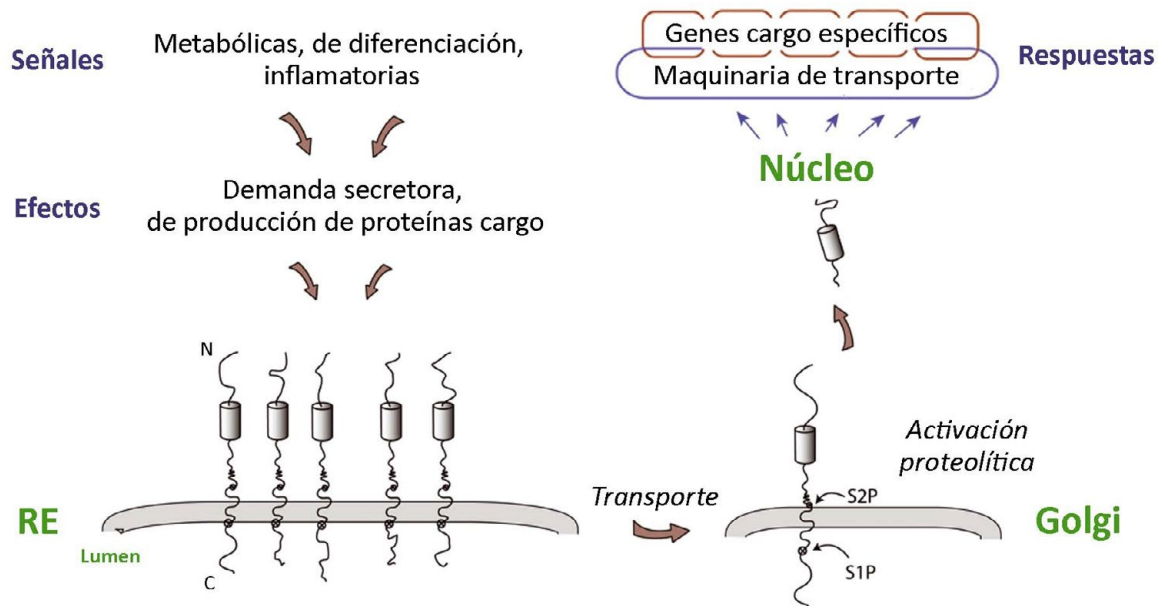
Recientemente, se ha descrito otra subfamilia de proteínas vinculada a UPR, a la que se conoce como la subfamilia de factores de transcripción bZip CREB3 (“cAMP responsive element binding protein 3”), la cual está integrada por 5 miembros: CREB3 (también conocido como LZIP o Luman), CREB3L1 (“cAMP responsive element binding protein 3-like 1”; OASIS), CREB3L2 (BBF2H7), CREB3L3 (CREB-H) y CREB3L4 (AlbZIP; Fig. 8), que poseen distribución tejida específica (Panagopoulos et al., 2007). Tienen un dominio bZIP que es el que media la unión con el ADN (Vinson et al., 2006). De manera similar a las proteínas de la vía UPR, las CREB3 se asocian a la membrana del RE donde se encuentran en su forma inactiva. Luego de un determinado estímulo, estas proteínas son transportadas del RE al complejo de Golgi donde son clivadas a su forma activa, por las proteasas del Sitio-1 (S1P) y la del Sitio-2 (S2P; Denard et al., 2012). El fragmento N-terminal liberado en dicho proceso se traslada al núcleo donde se une específicamente, a través de su dominio bZip, a las secuencias de ADN correspondientes al elemento respondedor a adenosín monofosfato cíclico (AMPC; CRE), al elemento respondedor a proteínas no plegadas (UPRE), a los elementos respondedores a estrés de RE (ERSE) I y II y al elemento box-B presentes en sus genes blanco (Lu et al., 1997; DenBoer et al., 2005; Ben Aicha et al., 2007; Jang et al., 2007; Audas et al., 2008; Murakami



**Figura 8. Representación esquemática de la subfamilia de factores de transcripción CREB3.** Los dominios bZIP se encuentran alineados. AT: dominio de activación transcripcional. bZIP: dominio básico de cremallera de leucinas. TM: dominio transmembrana. Adaptado de Chan et al., 2011.

et al., 2009; Chan et al., 2011). Sin embargo se desconocen los mecanismos que regulan la especificidad de unión de los factores CREB3 a cada una de estas secuencias de acuerdo al estímulo y al tejido en cuestión. Dependiendo del modelo empleado y del integrante de la familia de CREB3 en estudio, se ha descrito la capacidad que tienen estos factores para activar transcripcionalmente a una gran variedad de genes, incluyendo chaperonas del RE, proteínas de transporte, proteínas cargo específicas y también de ellos mismos (Fig. 9; Murakami et al., 2006; Bailey y O'Hare, 2007; Fox et al., 2010; Barbosa et al., 2013).

En los últimos años el espectro de actividad biológica de las proteínas CREB3 y de los factores canónicos de UPR se expandió más allá de su función como sensores de estrés de RE y UPR. Diversos estudios en una gran variedad de modelos sugieren que poseen una actividad más bien fisiológica, ya que tienen funciones cruciales en la regulación del desarrollo, metabolismo, inmunidad innata y secreción (Zhang et al., 2006; Ben Aicha et al., 2007; Murakami et al., 2009; Saito et al., 2009; Vellanki et al., 2010), e incluso alguno de ellos son capaces de regular negativamente la proliferación celular (Denard et al., 2011; Denard et al., 2012; Mellor et al., 2013). Asimismo, estudios *in vivo* de las proteínas canónicas de UPR sugieren que también participan en procesos fisiológicos de secreción, actuando paralelamente o corriente abajo de las proteínas CREB3 (Fox y Andrew, 2015). Trabajos recientes realizados en tejidos específicos (como hueso, cartílago; glía), proponen a la subfamilia de los factores de transcripción CREB3 como los principales reguladores de la capacidad secretora de células secretoras especializadas, coordinando la producción de cargo (con la cooperación de factores tejido-específicos) con la expresión de genes de la maquinaria de transporte, asegurando así un eficiente transporte de dicho cargo (Saito et al., 2009; Fox et al., 2010; Barbosa et al., 2013; Hino et al., 2014; Fox y Andrew, 2015).



**Figura 9. Regulación y respuesta de la subfamilia de factores de transcripción CREB3.** Las proteínas CREB3 son proteínas transmembrana que se encuentran inactivas en el RE. Cambios en las condiciones fisiológicas generan señales para promover el aumento de la producción de proteínas cargo específicas y de la capacidad secretora celular para asegurar el transporte eficiente de dicho cargo. Estas señales disparan la activación proteolítica de las proteínas CREB3, que es llevada a cabo en el Golgi por las proteasas S1P y S2P. Luego, el fragmento N-terminal liberado, que actúa como factor de transcripción, se traslada al núcleo para regular la expresión de sus genes blanco, dentro de los que se destacan los que codifican para proteínas de la maquinaria de transporte de la vía secretora temprana. Adaptado de Barbosa et al., 2013.

A pesar de los grandes avances realizados en ciertos tejidos sobre la función de los factores de transcripción de la subfamilia CREB3, aún quedan por esclarecer los mecanismos por los cuales regulan la capacidad secretora en diferentes tipos celulares, los inductores fisiológicos que inducen su activación y los mecanismos de reconocimiento de sus genes blanco. Este trabajo tiene como objetivo analizar los cambios moleculares y estructurales que ocurren en la vía secretora en respuesta a un estímulo secretor, estableciendo los mecanismos moleculares que regulan dichos cambios, a partir de la siguiente hipótesis:

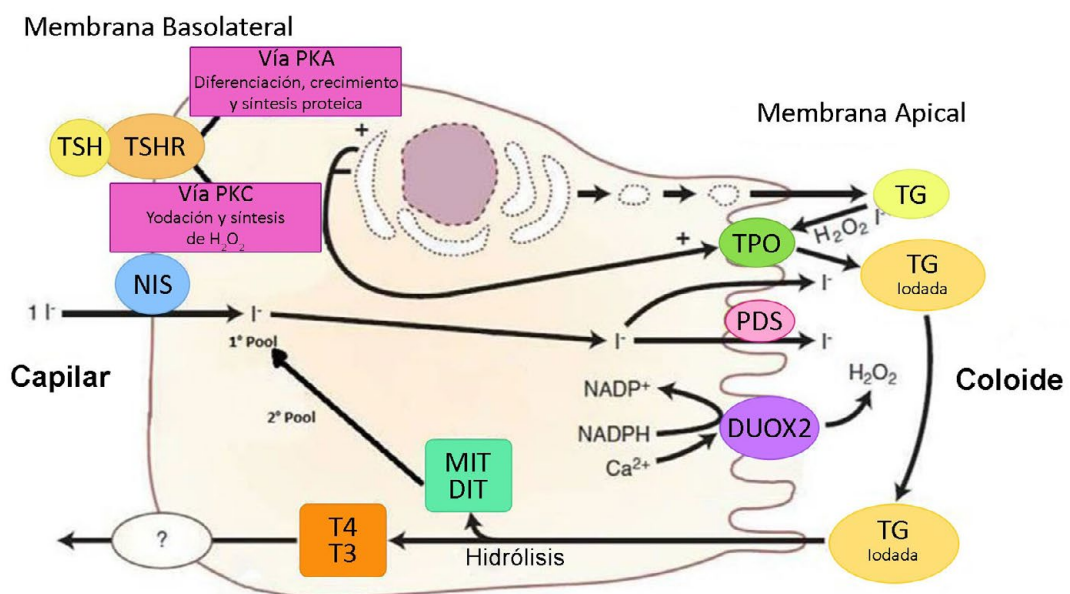
## Hipótesis II

Las vías de transporte intracelular de membranas son ubicuas, pero están diferencialmente desarrolladas en los diversos tejidos dependiendo de su función. En tejidos que poseen alta actividad secretora (como tiroides, placenta y células epiteliales bronquiales) los niveles de ARNm de proteínas involucradas en el transporte de membranas se encuentran significativamente elevados (Gurkan et al., 2005). Las células secretoras de diferentes tejidos deben adaptarse a la necesidad creciente de secreción de proteínas que ocurre durante el desarrollo, diferenciación o cambios de las condiciones fisiológicas. Basados en resultados de nuestro laboratorio y en antecedentes ya publicados, postulamos que, en situaciones donde la secreción está estimulada por factores tróficos existen mecanismos celulares encargados de modular la adaptación de la vía secretora y coordinando la producción de cargos específicos. Es decir, las células responden a estímulos fisiológicos adaptándose integralmente a una situación potencialmente estresante.

## Modelo de Trabajo

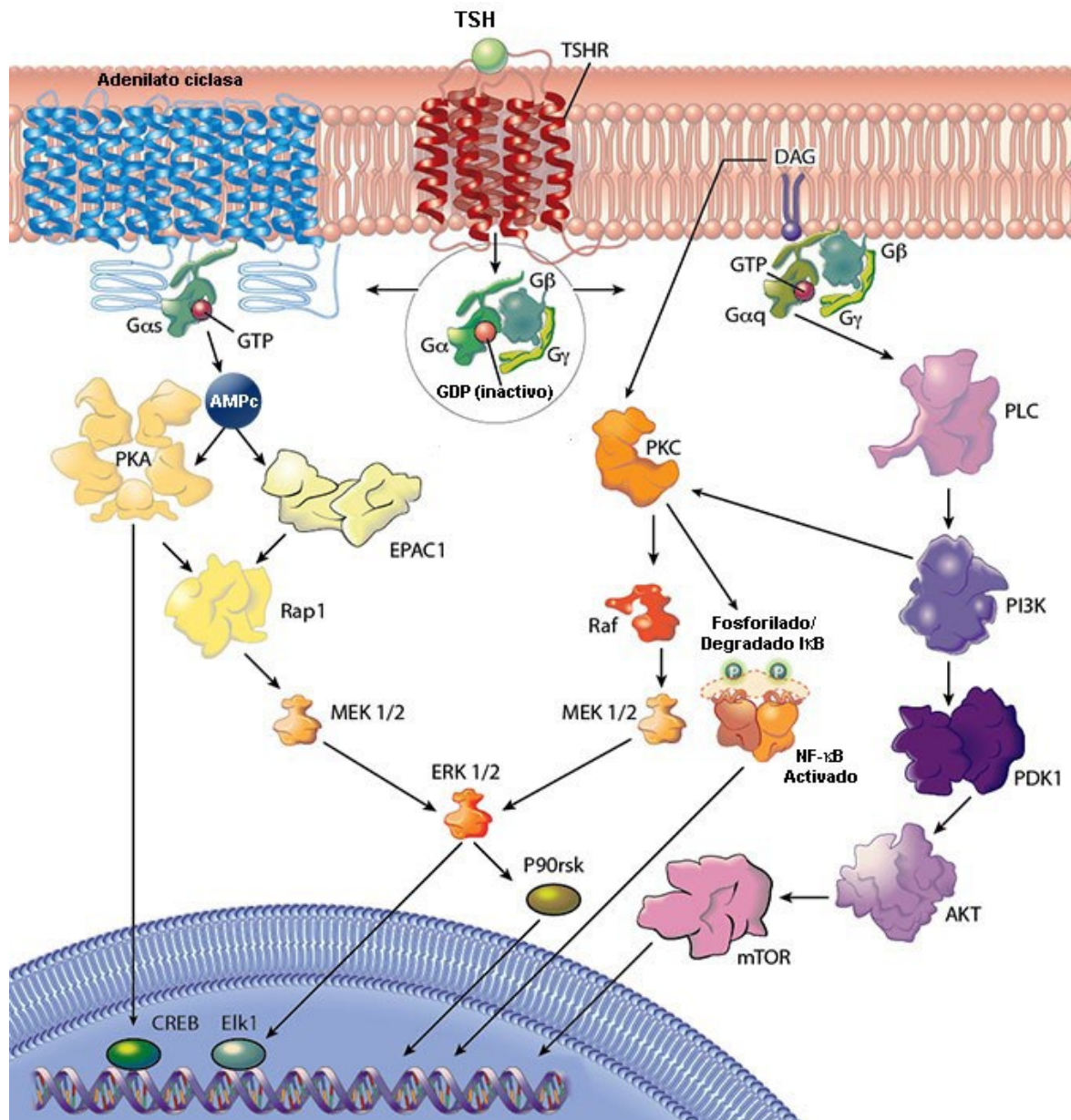
Para desarrollar la Hipótesis II y analizar los mecanismos que regulan la adaptación celular de la maquinaria de transporte a un estímulo secretor, desarrollamos como modelo secretor y respondedor a un estímulo específico la línea celular derivada de tiroides de rata Fischer, FRTL-5 (ATCC CRL 8305; Van Heuverswyn et al., 1984). Estas células mantienen las características funcionales de la secreción de Tiroglobulina (TG; Van Heuverswyn, 1984), la síntesis de Tiroperoxidasa (TPO; Isozaki et al., 1989) y del simportador de sodio-yoduro (NIS), y la incorporación de yoduro (Kogai, 1997) por periodos prolongados de cultivo, en respuesta a la hormona estimulante de tiroides (TSH) o Tirotrófina (Brown et al., 2000) y presentan una tasa de duplicación de 36 horas (Ambesi-Impiombato, 1980). TSH, mediante su receptor específico (TSHR), estimula la expresión de dichas proteínas las cuales son transportadas a sus correctas ubicaciones mediante la vía secretora. Así, NIS se localiza en la región basal de la membrana plasmática; TPO, en la interfase de la membrana apical y el coloide; y TG, en el coloide (Fig. 10).

El TSHR es integrante de la subfamilia de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCR). Su unión a TSH dispara principalmente la activación de dos vías de señalamiento (Fig. 11). Una, dependiente de proteína G subunidad  $\alpha$  ( $G_{\alpha s}$ ) que lleva a un incremento de AMPc a través de la enzima adenilato ciclasa. A su vez el AMPc activa a la proteína quinasa A (PKA), que posteriormente induce una cascada de fosforilación de proteínas citosólicas y nucleares, entre las cuales se encuentra CREB. Esta vía es la principal encargada de regular la proliferación de células foliculares tiroideas y la producción y liberación



**Figura 10. Síntesis de hormonas tiroideas.** Esquema representativo de las moléculas que participan en la producción de las hormonas tiroideas. Adaptado de Polonsky et al., 2011.

de las hormonas tiroideas (Vassart y Dumont, 1992). La otra vía, dependiente de proteína G subunidad  $\alpha_q$  ( $G\alpha_q$ ), induce la activación de vías dependiente de la proteína quinasa C (PKC) y fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), con fosforilación de Akt (Morshed et al., 2009). Estas intrincadas vías de señalamiento contienen múltiples módulos de complejas interacciones proteína-proteína que se ensamblan en múltiples compartimentos intracelulares para integrar, procesar y transmitir la información específica de la respuesta a TSH. Si bien se han descrito efectores específicos para cada una de estas dos vías, existen factores comunes donde ambas vías convergen, potenciando su efecto.



**Figura 11. Diagrama de las principales vías de señalización activadas por la unión de TSH a su receptor, TSHR.** La unión de TSH con TSHR resulta en la activación de dos clases principales de proteínas G,  $G\alpha_s$  y  $G\alpha_q$ . La vía de  $G\alpha_s$  señala mediante cAMP/PKA/ERK. Mientras que, la vía de  $G\alpha_q$  lo hace por PI3/Akt/mTOR, PKC/NF- $\kappa$ B, y PKC/c-raf/ERK/P90RSK. En conjunto, esto promueve el desarrollo y el funcionamiento de la glándula tiroidea. Adaptado de Reyna et al. 2013.

# **INTR.**

Cabe destacar que las células FRTL-5 proveen un excelente modelo fisiológico para el estudio de la adaptación celular a una mayor demanda secretoria en respuesta a un estímulo, ya que luego de la inducción con TSH se induce la expresión de proteínas cargo (como NIS, TG y TPO) las cuales utilizan la vía secretora para alcanzar sus correctas ubicaciones. Además, estas células mantienen su estado de diferenciación sin mayores transformaciones, presentando las mismas características bioquímicas y morfológicas representativas de cultivos primarios de células foliculares de tiroides, sin que se altere su viabilidad (Ambesi-Impiombato et al., 1980). Contrariamente, en otros modelos celulares, como células B, cultivos primarios placentarios, el estímulo secretor activa un proceso de diferenciación que culmina con la muerte celular programada de estas células.

**Objetivos**



## OBJETIVOS

### *Objetivo general*

El objetivo general del presente trabajo es evaluar los mecanismos moleculares que regulan el transporte de proteínas desde el Retículo Endoplásmico al complejo de Golgi. Principalmente nos enfocamos en analizar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la adaptación de la maquinaria de transporte a un estímulo secretor.

### *Objetivos específicos*

Los objetivos específicos planteados son:

- 1- Analizar la participación de Rab1b en la regulación de la función de COPII, evaluando:
  - 1.1- *la interacción de Rab1b con las proteínas del complejo COPII;*
  - 1.2- *la participación de Rab1b en la formación del complejo COPII;*
  - 1.3- *el efecto de Rab1b sobre la dinámica de asociación/disociación del complejo COPII a membranas.*
  
- 2- Analizar los cambios moleculares y estructurales que ocurren en la vía secretora de células tiroideas en respuesta a un estímulo secretor, evaluando:
  - 2.1- *cambios en la expresión de proteínas de la maquinaria de transporte;*
  - 2.2- *cambios en la expresión de transcritos de genes que codifican para factores de transporte;*
  - 2.3- *cambios morfológicos en el complejo de Golgi.*
  
- 3- Estudiar los mecanismos que regulan la capacidad secretora de células tiroideas en respuesta a TSH, determinando:
  - 3.1- *la cinética de expresión de factores de transporte y de proteínas cargo;*
  - 3.2- *la implicancia de la vía del AMPc en la adaptación celular;*
  - 3.3- *la participación de la subfamilia de factores de transcripción CREB3.*

# **Materiales y Métodos**

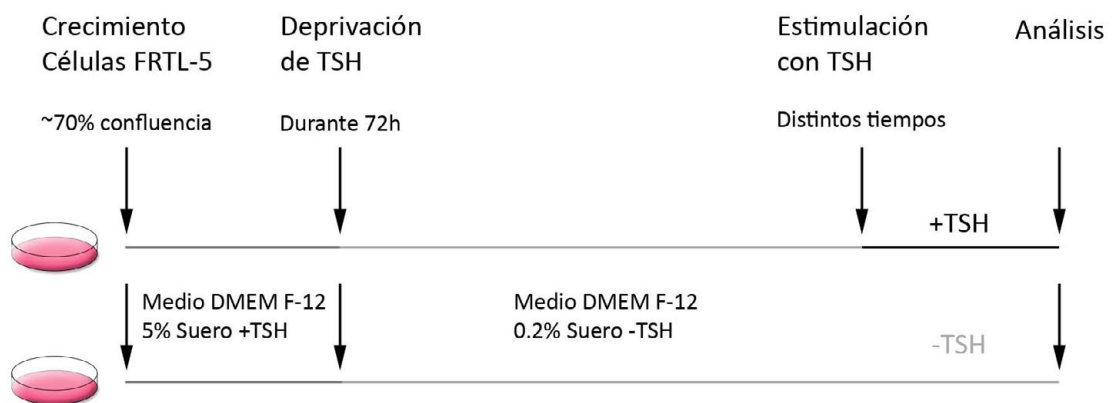
## 1. Cultivo de líneas celulares eucariotas

Para llevar a cabo los diferentes experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron las siguientes líneas celulares:

- células humanas HeLa (ATCC). Esta línea celular epitelial deriva de un adenocarcinoma de cérvix conteniendo el virus papiloma humano 18 (HPV-18).
- células humanas embrionarias de riñón HEK293T (ATCC). Esta línea celular epitelial se generó a partir de la transformación de células normales de riñón con ADN del adenovirus 5.
- células derivadas de tiroides de rata FRTL-5 (ATCC).

En los ensayos desarrollados en el capítulo 1 de esta tesis se utilizaron las líneas celulares HeLa y HEK293T, las cuales se crecieron en medio D-MEM (GIBCO) alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA, Greiner Bio One), 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin (GIBCO). Ambas líneas celulares se cultivaron en un incubador apropiado con temperatura constante de 37°C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

En los ensayos descritos en los capítulos 2 y 3 se utilizó la línea celular derivada de tiroides de rata FRTL-5. Esta células se crecieron a 37°C, en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, en medio D-MEMF12 (GIBCO) alta glucosa suplementado con 5% de suero de ternero recién nacido (GIBCO), 1 mU/mL de TSH bovina (generosamente provista por el Dr. Albert F. Parlow, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, National Hormone and Peptide Program, National Institutes of Health, Torrance, CA), 10 µg/mL de insulina bovina (Sigma-Aldrich), 5 mg/mL de transferrina bovina (Sigma-Aldrich), 50 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de estreptomycin (GIBCO). A una determinada confluencia (~70%), las células se mantuvieron por 72 hs en la misma composición de medio pero sin TSH y conteniendo 0,2% de suero (medio basal - deprivación). Luego, parte de las células deprivadas se estimularon con 1 mU/mL de TSH durante diferentes periodos de tiempo para llevar a cabo el análisis comparativo entre las distintas poblaciones: -TSH (o basal); +TSH (Fig. 12).



**Figura 12. Esquema representativo del diseño experimental.**

En algunos ensayos se determinó el efecto del agonista sintético de AMPc, Forskolina (FSK), donde las células deprivadas se estimularon con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de FSK (+FSK).

## 2. Construcciones de plásmidos

Los plásmidos pEGFP-Rab1b (proteína salvaje), Rab1Q67L-myc, pEGFP-Rab1Q67L (mutantes positivas) y pEGFP-Rab1bN121I (mutante dominante negativa) que codifican para la proteína de fusión Rab1b, fueron generados previamente y están descritos detalladamente en (Alvarez et al., 2003). La construcción Sec13-YFP fue gentilmente provista por el Dr. Benjamin Glick (University of Chicago, Estados Unidos), GFP-Sec16, por el Dr. David Stephens (University of Bristol, Reino Unido), GFP-Rab7, por el Dr. José Daniotti (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). Los vectores pcDNA3 conteniendo a CREB3L1 en su versión salvaje (Full length, CREB3L1FL); en su forma procesada, constitutivamente activa (CREB3L1CA); o la dominante negativa (CREB3L1DN), fueron generosamente donados por los Doctores Deborah J. Andrew (The Johns Hopkins University, Estados Unidos) y David Murphy (University of Bristol, United Kingdom - University of Malaya, Malasia; Fox et al., 2010; Greenwood et al., 2014).

## 3. Células bacterianas

En este trabajo de tesis se utilizaron bacterias de la cepa *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  para el mantenimiento y amplificaron de plásmidos.

### 3.1 Preparación de bacterias

Para poder introducir ADN foráneo con alta eficiencia dentro de bacterias es necesario inducir el “estado de competencia” de las mismas. En el caso de la transformación por electroporación no es necesario inducir dicho estado de competencia, simplemente las bacterias de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento se lavan varias veces para eliminar todas las sales que puedan estar presentes.

Para preparar las bacterias se partió de una cepa fresca de bacterias conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , las cuales se repicaron en medio LB-Agar (Luria Bertani-Agar) y se incubaron toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Luego, se tomó una colonia aislada y se incubó en 5 mL de medio LB modificado (conteniendo 0,5% de NaCl) toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se inocularon 250 mL de medio LB modificado con 2 mL del cultivo anterior y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación hasta una  $\text{DO}_{600}=0,5-1$ . El cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante en condiciones de esterilidad. Las bacterias se colocaron en hielo durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . A partir de este momento el procedimiento se realizó manteniendo las células en hielo y en condiciones de asepsia (cuando sea necesario) para asegurar la esterilidad de las mismas. Las bacterias se resuspendieron suavemente en 250 mL de agua

# Mat. y Met.

milli-Q estéril y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron suavemente en 125 mL de agua milli-Q estéril y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, las bacterias se resuspendieron suavemente en 5 mL de agua milli-Q estéril y se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 750 µL de glicerol estéril al 10% v/v en agua milli-Q estéril. Se prepararon alícuotas de 50 µL por eppendorf y se almacenaron a -80°C hasta el momento de su uso.

## *3.2 Transformación de bacterias por electroporación*

En el proceso de electroporación, se somete a las bacterias a un campo eléctrico que desestabiliza a la pared y a membrana celular, induciendo la formación de poros temporarios por los que ingresa el ADN a las bacterias. Para llevar a cabo este proceso se descongelaron las bacterias en hielo y se agregó 1 µL de ADN, incubando durante 1 minuto. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación estéril y se la colocó en el electroporador. Se aplicó el pulso eléctrico e inmediatamente después se agregaron 900 µL de medio LB y se transfirió el cultivo a un tubo eppendorf estéril. Las células se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación. Finalmente se plaqueó un porcentaje del cultivo en medio LB-Agar conteniendo el antibiótico apropiado para permitir la selección de las bacterias transformadas.

## *3.3 Purificación de plásmidos*

Para la purificación de plásmidos a partir de bacterias transformadas se utilizó el kit comercial de mini preparaciones QIAprep (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento se basa en la lisis alcalina de las bacterias, seguida de la adsorción del ADN en columnas de sílice en presencia de altas concentraciones de sales. Brevemente, se inocularon 5 mL de LB suplementado con el antibiótico apropiado con una colonia aislada de bacterias transformadas y se incubó toda la noche a 37°C con agitación. El cultivo se transfirió a tubos eppendorf y se centrifugó a 5000 rpm durante 3 minutos, descartando el sobrenadante. Las bacterias se resuspendieron en 250 µL de Buffer P1 (50 mM de Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/mL de RNasa A; pH 8). Luego se adicionaron 250 µL de Buffer P2 (200 nM de NaOH; 1% de SDS), se mezcló invirtiendo el tubo 4-6 veces y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. La muestra se neutralizó mediante el agregado de 350 µL de Buffer N3 (4,2 M de cloruro de guanidinio; 0,9 M de acetato de potasio; pH 4,8), mezclando inmediatamente después por la inversión del tubo 4-6 veces. La muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se colocó en una columna. La muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto y se descartó el líquido. La columna se lavó con 500 µL de Buffer PB (5 M de cloruro de guanidinio; 30% de isopropanol) y se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto, descartando el líquido. La columna se lavó con 750 µL de Buffer PE (10 mM de Tris-HCl pH 7,5; 80% de etanol) y se centrifugó

# Mat. y Met.

a 13000 rpm por 1 minuto, descartando el líquido. Nuevamente se centrifugó a 13000 rpm por 1 minuto para eliminar restos de etanol del buffer de lavado. La columna se colocó en un tubo eppendorf limpio y el ADN se eluyó adicionando 50  $\mu$ L de una dilución 1/3 de buffer EB (10 mM de Tris-HCl pH 8,5) en agua milli-Q estéril, incubando 5 minutos y centrifugando a 13000 rpm por 1 minuto. El ADN se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso.

La concentración del ADN se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, sabiendo que 1  $\text{DO}_{260}$  equivale a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ADN. La pureza se evaluó a través de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm, leídas en el lector de multiplacas Biotek, considerándose valores aceptables entre 1,8 y 2. La integridad del ADN se evaluó a través de la visualización de una alícuota en un gel de agarosa al 1,2%. La corrida se realizó durante 30 minutos a 80V y se visualizó en transiluminador.

## 4. Transfección de líneas celulares

Para realizar las transfecciones de líneas celulares se utilizó el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones.

24 horas antes de la transfección, las células se colocaron en el formato de placa adecuado teniendo en cuenta el tipo de análisis a realizar, en el medio de crecimiento apropiado. Al momento de la transfección, la confluencia de las células debe ser  $\sim 70\%$ . 30 minutos antes de la transfección, las células se lavaron 3 veces con PBS y el medio de crecimiento de cada placa se reemplazó por Optimem (GIBCO) conteniendo el mismo porcentaje de suero que el medio de crecimiento. La mezcla de transfección se preparó de la siguiente manera: en un tubo eppendorf conteniendo Optimem, se agregaron el/los plásmido/s de interés; mientras que en otro tubo eppendorf conteniendo Optimem se agregó el reactivo de transfección en una proporción ADN total:reactivo = 1:3. Cada mezcla se incubó por separado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se mezcló el contenido de cada tubo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, a cada placa se le agregó la mezcla de transfección y se incubó durante 4-6 horas en las condiciones de crecimiento. Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS y se cambió el medio de transfección por medio de crecimiento apropiado.

En el caso de células HeLa o HEK293T, se procedió al análisis después de 24-48 horas de transfección.

Para células FRTL-5, pasadas las 24 horas de transfección las células se privaron por 36 horas utilizando medio basal. Luego, parte de las células se estimularon con el agregado de 1 mU/mL de TSH durante diferentes tiempos y se procedió al análisis correspondiente.

A continuación se detallan las cantidades de reactivos utilizados según el formato de placa empleado.

Formato de placa	Volumen de Optimen/placa	ADN plasmídico/ Volumen de Optimen	Lipofectamina 2000/Volumen de Optimen
35 mm (MW6)	500 $\mu$ L	2 $\mu$ g en 250 $\mu$ L	6 $\mu$ L en 250 $\mu$ L
60 mm	1 mL	4 $\mu$ g en 500 $\mu$ L	10 $\mu$ L en 500 $\mu$ L

## 5. Análisis proteico: Inmunomarcaciones y Western blot

Para analizar la localización subcelular y los niveles de expresión de proteínas de interés, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, mientras que para un estudio cuantitativo se realizaron ensayos de Western blot, como se detalla a continuación.

### 5.1 Inmunofluorescencias sobre células

Las células se crecieron sobre cubreobjetos estériles dispuestos dentro de las placas de cultivo. Luego de transcurrido el tiempo necesario acorde al experimento realizado, se levantaron los cubreobjetos con las células adheridas y se colocaron en una cámara húmeda; se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con para-formaldehído al 3% en PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos. Inmediatamente las células fijadas se incubaron con solución 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en PBS por 10 minutos. Se lavaron 3 veces (3 minutos cada lavado) con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,01% en PBS durante 7 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS (3 minutos cada lavado). Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios se efectuaron 2 bloqueos (5 minutos cada uno), el primero con PBS 0,2% Tween-20 (Promega - PBS-T) conteniendo 2,5% de suero de cabra (GS - Sigma-Aldrich) y el otro con PBS-T conteniendo 0,4% de gelatina de piel de pescado (FSG - Sigma-Aldrich). Posteriormente, se incubaron los anticuerpos primarios diluidos en FSG por 45 minutos a 37°C. El volumen final utilizado fue de 30  $\mu$ L por cubreobjeto. Se realizaron 3 lavados con PBS-T (5 minutos cada lavado) y se repitió el protocolo de bloqueo. A continuación, se incubaron los anticuerpos secundarios y el colorante de núcleos (Hoechst, Molecular Probes) diluidos en GS por 30 minutos a 37°C. El volumen final utilizado fue de 30  $\mu$ L por cubreobjeto. Se realizaron 5 lavados con PBS-T (5 minutos cada lavado). Por último, cada vidrio se enjuagó en agua destilada y se montó sobre un portaobjetos empleando una gota de Mowiol (Calbiochem). Las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento de su análisis. Para su observación se utilizó tanto un microscopio de epi-fluorescencia: Nikon Eclipse TE-2000 (CIBICI-CONICET); como microscopios de fluorescencia confocal: Zeiss LSM5 Pascal, Olympus FluoView 1000 Espectral, Olympus FluoView 300 (Sistema Nacional de Microscopía).

# Mat. y Met.

Cabe aclarar que, cuando se emplearon anticuerpos primarios originados en cabra, se llevó a cabo un único bloqueo, previo a la incubación de los anticuerpos primarios, con PBS-T conteniendo 2% de BSA durante 20 minutos a temperatura ambiente. Además, tanto los anticuerpos primarios como los secundarios se incubaron en PBS-T conteniendo 1% de BSA durante 1 hora a 37°C. Asimismo, se tuvo en cuenta que los anticuerpos secundarios no hayan sido originados en cabra, para evitar posibles reacciones cruzadas.

## 5.1.1 Anticuerpos utilizados

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:

Nombre	Isotipo	Dilución	Compañía
GM130	Ratón	1/200	BD
Rab1b	Conejo	1/30	Santa Cruz
p115	Conejo	1/500	Casero
GBF1	Ratón	1/150	BD
Arf1	Ratón	1/150	Abcam
Sec16b	Conejo	1/200	Bethyl
Sec23a	Conejo	1/200	Sigma-Aldrich
Sec31	Ratón	1/200	BD
Golgin97	Ratón	1/200	Molecular Probes
GalNAcT2	Conejo	1/200	Sigma-Aldrich
Calreticulina	Conejo	1/1000	Thermo
SRP54	Ratón	1/500	BD
GFP	Ratón	1/200	Abcam
GFP	Conejo	1/1000	Living Colors BD
CREB3L1	Conejo	1/300	Aviva
CREB3L1	Cabra	1/300	R&D
CREB3L2	Conejo	1/300	Aviva
NIS	Conejo	1/1000	Casero



# Mat. y Met.

El anticuerpo que reconoce a NIS (Levy et al., 1997) fue gentilmente donado por la Dra. Nancy Carrasco (Yale University School of Medicine, Estados Unidos).

Se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios:

Nombre	Isotipo	Dilución	Compañía
Alexa Fluor 488 anti IgG de ratón	Cabra/Burro	1/800	Life Technologies
Alexa Fluor 488 anti IgG de conejo	Cabra/Burro	1/800	Life Technologies
Alexa Fluor 594 anti IgG de ratón	Cabra/Burro	1/800	Life Technologies
Alexa Fluor 594 anti IgG de conejo	Cabra	1/800	Life Technologies
Alexa Fluor 488 anti IgG de cabra	Burro	1/800	Life Technologies

## 5.2. Detección de proteínas por ensayos de Western blot

### 5.2.1 Preparación de extractos proteicos celulares totales.

Para obtener extractos proteicos celulares totales las células se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente se trataron con tripsina (GIBCO) durante 2-3 minutos a 37 °C. Una vez desprendidas las células, se agregó medio suplementado con suero y se centrifugó por 5 minutos a 900 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con PBS, centrifugando 5 minutos a 900 rpm luego de cada lavado. Para la lisis, las células se resuspendieron en 100 µL de buffer RIPA (50mM de Tris-HCl pH 8; 150 mM de NaCl, 1% de NP40, 0,5% de Deoxicolato de sodio, 0,1% de SDS), conteniendo inhibidores de proteasas (Roche) y se incubaron 30 minutos en hielo. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

### 5.2.2 Determinación de la concentración de proteínas. Método de Bradford

El reactivo de Bradford permite medir sensiblemente proteínas en soluciones a concentraciones bajas. Para su preparación, una parte del reactivo comercial (5X, BIO-RAD) se diluyó en 4 partes de agua destilada. Posteriormente se filtró la dilución en papel

# Mat. y Met.

Whatman #1 para remover impurezas no solubles del reactivo. Esta solución filtrada (solución 1X de Bradford) es estable por dos semanas.

Para la cuantificación de proteínas mediante este método, se utilizó BSA como estándar. A partir de una solución madre de 1 µg/µL de BSA se prepararon diluciones en solución 1X de Bradford para confeccionar una curva de calibración con los puntos: 0 µg/mL (solo reactivo); 2 µg/mL; 4 µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 6 µg/mL; 8 µg/mL; 10 µg/mL; 12 µg/mL y 14 µg/mL que cubren el rango analítico del método. Las muestras problema se prepararon a partir de 2 µL de las mismas en 1 mL de la solución 1X de Bradford. En una placa de 96 pocillos se colocaron por triplicado 200 µL de los estándares y de las muestras problema y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas de ELISA (BIO-RAD). Se graficaron las unidades de absorbancia en función de la concentración y se realizó análisis de regresión lineal simple. Se consideró  $R^2 > 0,95$  para que la curva sea estadísticamente aceptable. A partir de la ecuación de la recta se despejó el valor de concentración de las muestras problema.

## *5.2.3 Separación de proteínas por peso molecular en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS)*

Las muestras a analizar se prepararon en buffer de siembra Laemmli (60 mM de Tris-HCl pH 6,8; 10% de glicerol; 2% de dodecilsulfato sódico; 1% de 2-mercaptoetanol y 0,002% de azul de bromofenol) conteniendo 20 µg de los extractos proteicos totales, se hirvieron 5 minutos (excepto para la detección de NIS) y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos. Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) al 10 %, durante 60 minutos a 150 V en buffer de corrida (25 mM de Tris-base, 192 mM de glicina y 1% de SDS). Una vez terminada la corrida electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific) mediante transferencia húmeda (buffer de transferencia: 25 mM de Tris-HCl pH 8,8; 192 mM de glicina; 20% de metanol) durante 60 minutos a 100 V. Posteriormente, la membrana se coloreó con rojo Ponceau (0,1% de Rojo Ponceau en solución acuosa al 5% de ácido acético) para controlar el proceso de transferencia. La membrana se decoloró mediante lavados con TBS 1X (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,8) y se bloqueó con la solución de bloqueo TBS con 0,2% de Tween-20 (TBS-T) y 5% de leche descremada (Svelty), o con 5% de BSA en TBS-T, durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C bajo agitación. Los anticuerpos primarios se diluyeron en TBS, en TBS-T con 5% de BSA o en TBS con 5% de leche. Luego, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T y uno con TBS. La membrana se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente bajo agitación con el anticuerpo secundario correspondiente, dependiendo del sistema de detección a utilizar,

según se detalla posteriormente. Finalmente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T y uno con TBS, y se prosiguió con la detección.

- Detección por quimioluminiscencia: se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, diluidos en TBS con 5% de leche. Luego del último lavado, la membrana de nitrocelulosa se incubó durante 5 minutos con el reactivo de quimioluminiscencia ECL (SuperSignal West Pico; Pierce) y se expuso a placa radiográfica (Kodak y GE) durante 1-10 min. La señal revelada se cuantificó utilizando el software de análisis de imágenes GELPRO32.

- Detección por fluorescencia: se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con los fluorescentes IRDye 800CW o IRDye 680RD (LiCor Biosciences), diluidos en TBS. La señal se observó y analizó en el equipo lector OdysseyClx (LiCor Biosciences) a través del programa Image Studio.

Para la cuantificación se consideró GAPDH como control de carga, ya que sus niveles no varían con los tratamientos. Los valores obtenidos de intensidad de fluorescencia o de la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas analizadas, se normalizaron con los valores de GAPDH y se relativizaron a la condición control de cada ensayo, valor que se consideró igual a 1.

#### 5.2.4 Anticuerpos utilizados

Nombre	Isotipo	Dilución	Compañía
GM130	Ratón	1/250	BD
Rab1b	Conejo	1/100	Santa Cruz
p115	Conejo	1/500	Casero
GBF1	Ratón	1/500	BD
Arf1	Ratón	1/250	Abcam
Sec31	Ratón	1/500	BD
Sec23a	Conejo	1/2000	Sigma-Aldrich
Sec24	Ratón	1/500	Abnova
Golgin97	Ratón	1/500	Molecular Probes
Calreticulina	Conejo	1/2000	Thermo Scientific
SRP54	Ratón	1/1000	BD

GFP	Conejo	1/1000	Living Colors BD
CREB3L1	Conejo	1/700	Aviva
CREB3L1	Cabra	1/700	R&D
CREB3L2	Conejo	1/700	Aviva
NIS	Conejo	1/1000	Casero
Rab5a	Conejo	1/1000	Abcam
GAPDH	Ratón	1/12000	Abnova
Calnexina	Conejo	1/1000	Santa Cruz

Se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios:

Nombre	Dilución	Compañía
Anti IgG de ratón HRP	1/5000	Life Technologies
Anti IgG de conejo HRP	1/5000	Life Technologies
Anti IgG de cabra HRP	1/5000	Life Technologies
IRDye 800CW anti IgG de conejo	1/10000	LiCor Biosciences
IRDye 800CW anti IgG de ratón	1/10000	LiCor Biosciences
IRDye 680RD anti IgG de ratón	1/10000	LiCor Biosciences

## 6. Co-inmunoprecipitación

La técnica de co-inmunoprecipitación permite detectar interacciones proteína-proteína. La proteína de interés se aísla utilizando un anticuerpo específico acoplado a un sustrato sólido. Las moléculas que interactúan con la proteína de interés se identifican posteriormente mediante ensayos de Western blot.

### 6.1 Preparación de extractos proteicos celulares totales.

Células HEK-293T transfectadas con plásmidos que expresan GFP-Rab1b o GFP-Rab7, se cultivaron por 48 horas en placa de 10 cm, se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente

# Mat. y Met.

se trataron con tripsina (GIBCO) durante 2-3 minutos a 37°C. Una vez desprendidas las células, se agregó medio suplementado con suero y se centrifugó por 5 minutos a 900 rpm. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron 2 veces con PBS, centrifugando 5 minutos a 900 rpm luego de cada lavado. Para la lisis, las células se colocaron en hielo y se resuspendieron en 300 µL de buffer no desnaturizante (20 mM de Tris-HCl pH 8; 137 mM de NaCl; 10% de Glicerol, 1% de NP40, 2 mM de EDTA), conteniendo inhibidores de proteasas (Roche) y 100 µM de GMP.PNP (análogo no hidrolizable de GTP, que mantiene a las Rab GTPasas en su forma activa - Sigma-Aldrich). Las muestras se incubaron 30 minutos a 4°C en agitación. Se guardó el 10% del lisado como control (Extracto total). Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo pre-enfriado. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis.

## *6.2 Preparación de las partículas magnéticas de proteína G Agarosa y unión del anticuerpo.*

Se colocaron 10 µL de la mezcla que contiene las partículas magnéticas de proteína G Agarosa ("Protein G Mag Sepharose" – General Electric) por tubo eppendorf de reacción. Se removió la solución de almacenamiento colocando los tubos en un soporte magnético. Las partículas se equilibraron lavando 2 veces con 500 µL de TBS, removiendo el líquido luego de cada lavado con la ayuda del soporte magnético. Inmediatamente después, las partículas se resuspendieron en 100 µL de TBS y se incubaron con 3 µL de anticuerpo monoclonal contra GFP (1 µg/µL; Abcam) en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se removió el líquido y se lavó con 500 µL de TBS. Se realizó un lavado con 500 µL de solución 200 mM de trietanolamina pH 8,9 (de ahora en más trietanolamina) y se removió el líquido. Se llevó a cabo la unión covalente del anticuerpo a las partículas empleando 500 µL de trietanolamina con 50 mM de DMP (preparado en trietanolamina - Pierce) e incubando en agitador rotacional durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se removió el líquido y se lavó con 500 µL de trietanolamina. Luego, las partículas se bloquearon con 500 µL de solución 100 mM de etanolamina pH 8,9 incubando en agitador rotacional durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se removió el anticuerpo no unido utilizando 500 µL de buffer de elución (0,1 M de Glicina-HCl pH 2,5 – 3). Se descartó el líquido y se lavó 2 veces con 500 µL de TBS.

## *6.3 Unión de la proteína blanco al anticuerpo presente en las partículas magnéticas de proteína G Agarosa*

Para evitar uniones inespecíficas, las partículas magnéticas de proteína G Agarosa se bloquearon con 100 µL de BSA al 0,1% en buffer de lisis durante 60 minutos a 4°C con agitación. Se descartó el líquido y cada tubo de reacción conteniendo las partículas magnéticas de proteína G Agarosa unidas al anticuerpo se incubó con 600 µg de muestra

# Mat. y Met.

en 400  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 1M (pH 7,4) durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitador rotacional. Se removió y se colectó la fracción no unida. Se procedió a lavar con 500  $\mu\text{L}$  de TBS, descartando el líquido. La fracción proteica unida al anticuerpo presente en las partículas magnéticas de proteína G Agarosa se obtuvo adicionando 19  $\mu\text{L}$  de buffer de elución e incubando por 2 minutos a temperatura ambiente. Se recolectó la fracción de elución y se repitió una vez más el paso de elución. Finalmente se neutralizó la muestra empleando 2  $\mu\text{L}$  de buffer fosfato 1 M (pH 8).

Para la detección se llevó a cabo el protocolo de Wester blot descrito previamente, utilizando anticuerpos que reconocen a Sec23, Sec24, Sec31, GFP y p115.

## 7. Ensayos de recuperación de la fluorescencia luego del foto-blanqueado (FRAP)

La técnica de FRAP permite evaluar la dinámica de asociación/disociación de una proteína de interés a una determinada membrana. Este ensayo consiste en la pérdida irreversible de la fluorescencia de una región celular que contiene la proteína de interés (foto-blanqueado), mediante la exposición a altas intensidades de luz, y en la posterior recuperación de la fluorescencia en esa región, que implica el ingreso de nuevas moléculas fluorescentes.

Se sembraron células HeLa en placas con fondo de vidrio (WillCo-dish, Warner Instruments) conteniendo medio D-MEM sin rojo de fenol (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA). Se llevó a cabo la co-transfección de Sec13-YFP y Rab1bQ67L-myc, o de GFP-Sec16 y CFP-Rab1Q67L, según el protocolo de transfección transiente detallado anteriormente. Durante la captura de imágenes, las células se mantuvieron en incubador (INU, Tokai Hit) con controlador de temperatura (Tritech DigiTherm temperature controller) programado a 37°C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. Las imágenes se capturaron con un objetivo de 63x apocromático (z-stack 0,7  $\mu\text{m}$ ) y zoom de 2X. Para el análisis de GFP en células que expresan CFP, la excitación se realizó a 488 nm empleando un láser de argón y la emisión de GFP se detectó entre 510 y 540 nm. Bajo estas condiciones, la emisión de CFP no es detectada.

Para realizar los ensayos de FRAP en células que expresan Sec13-YFP, se utilizó el microscopio de fluorescencia confocal Zeiss LSM5 Pascal (Sistema Nacional de Microscopía). Previo al foto-blanqueado, se tomó una imagen con una intensidad de láser del 0,05%. Luego, se blanqueó la región de interés (RDI) mediante la exposición al 100% de intensidad del laser durante 3 segundos y posteriormente se monitoreó la recuperación de la fluorescencia tomando imágenes cada 10 ó 20 segundos a una intensidad de láser del 0,05%. En los mismos períodos de tiempo, se determinó la intensidad de fluorescencia de una región de referencia (RDR), seleccionada fuera del RDI. Se calculó el promedio de

las intensidades de fluorescencias empleando el software Metamorph (Universal Imaging Corporation). Finalmente, se graficó el porcentaje de recuperación de fluorescencia en función del tiempo de acuerdo a la siguiente fórmula:  $F(t) = (F_{RDI} / F_{RDR}) / (F_{preRDI} / F_{preRDR}) \times 100$ , donde  $F_{preRDR}$  es la intensidad de fluorescencia de RDR antes del foto-blanqueado,  $F_{RDR}$  es la intensidad de fluorescencia de RDR al tiempo  $t$ ,  $F_{preRDI}$  representa la intensidad de RDI antes del foto-blanqueado y  $F_{RDI}$  es la intensidad de fluorescencia de RDI al tiempo  $t$ . Cabe destacar que sobre las células analizadas se realizaron ensayos de inmunofluorescencia empleando el anticuerpo monoclonal que reconoce myc, para determinar la co-expresión de Rab1bQ67L-myc.

Para realizar los ensayos de FRAP en células que expresan GFP-Sec16, se utilizó el microscopio de fluorescencia confocal Olympus FluoView 300 (Sistema Nacional de Microscopía). La recuperación de la fluorescencia se monitoreó escaneando cada 3 segundos a una intensidad de láser del 0.05%. Se calculó el promedio de las intensidades de fluorescencias empleando el software ImageJ.

## 8. Determinación de niveles de transcritos

### 8.1 Purificación de ácido ribonucleico (ARN) total de células eucariotas en cultivo

Células provenientes de una placa de 60 mm se lavaron 3 veces con PBS 1X (solución salina de fosfatos) y se lisaron con 1 mL de TRIzol (Invitrogen). El protocolo de purificación de ARN se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, luego de la lisis con TRIzol, el homogeneizado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo por cada mL de TRIzol empleado, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó por 2-3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. De las 2 fases resultantes el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa (superior), por lo que dicha fase se transfirió a un nuevo tubo y el ARN se precipitó empleando 0,5 mL de isopropanol 100% por cada mL de TRIzol utilizado, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de etanol 75% por cada mL de TRIzol utilizado, se agitó suavemente empleando vortex y se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 7500 x g por 5 minutos a 4°C para eliminar los restos de alcohol. El ARN precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20-30  $\mu$ L de agua libre de ARNasas (GIBCO). Las muestras se conservaron a -80°C hasta su análisis.

La concentración del ARN se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 260 nm, sabiendo que 1  $DO_{260}$  equivale a 40  $\mu$ g/mL de ARN. La pureza se evaluó a través de la relación de absorbancias obtenidas a 260 y 280 nm, leídas en el lector de multiplacas Biotek, considerándose valores aceptables entre 1,8 y 2.

# Mat. y Met.

La integridad del ARN se evaluó a través de la visualización de una alícuota en un gel de agarosa desnaturalizante (1,2% de agarosa y 1,1% de formaldehído en buffer MOPS). Para ello se sembró en dicho gel una mezcla de 2,5  $\mu\text{L}$  de muestra junto con 5,6  $\mu\text{L}$  de formamida deionizada, 2  $\mu\text{L}$  de formaldehído, 1,1  $\mu\text{L}$  de buffer ácido 3-(Nmorfolino) propanesulfónico (MOPS) y 1  $\mu\text{L}$  de Bromuro de Etidio; previamente incubada por 10 min a 65°C a fin de destruir estructuras secundarias. La corrida se realizó durante 30 minutos a 80V y se visualizó en transiluminador. Se consideró que la muestra tiene integridad adecuada cuando la relación de intensidad entre las bandas correspondientes a la subunidad 28S respecto a la 18S es cercana a 2.

## *8.2 Reacción de Transcripción Reversa: Conversión de ARN a ácido desoxirribonucleico copia (ADNc)*

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN purificado en un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . Tubos conteniendo 1  $\mu\text{g}$  de ARN se incubaron con 1 U/ $\mu\text{L}$  de inhibidores de ribonucleasas RNasin (Promega), 4  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción comercial 5X (Promega), 0,25  $\mu\text{g}$  de una mezcla de hexadeoxinucleótidos de secuencias al azar (cebadores de la transcriptasa reversa, Random Primers - Promega) y cantidad necesaria de agua libre de ARNasas (GIBCO), a 65°C durante 15 minutos para destruir estructuras secundarias. La mezcla se enfrió inmediatamente en hielo para evitar la regeneración de dichas estructuras. Posteriormente se agregó 1 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTPs - Invitrogen) y 10 U/ $\mu\text{L}$  de la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Promega) y la mezcla se incubó a 37°C por 60 minutos. Finalmente la reacción se inactivó a 95°C durante 3 minutos.

## *8.3 Amplificación semicuantitativa de ADNc de $\beta$ -Actina por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

A fin de corroborar la síntesis adecuada de ADNc, se realizó una PCR para amplificar un fragmento característico del ADNc correspondiente al ARNm del gen que codifica a la proteína  $\beta$ -Actina, utilizado como control de carga endógena. Para ello se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción comercial 10X (Invitrogen), 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen), 250  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (Invitrogen), 1,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), 1  $\mu\text{M}$  de los cebadores correspondientes a  $\beta$ -Actina (Sigma-Aldrich), 10  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/5 del ADNc obtenido en el ensayo de transcripción reversa descrito en el ítem anterior y cantidad necesaria de agua libre de ARNasas (GIBCO) para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ . El protocolo de ciclado se realizó en un termociclador MULTIGENE de LabMet y consistió en un paso de desnaturalización de 5 minutos a 95°C; seguido por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos; la extensión final fue de 10 minutos a 72°C. Finalmente se observó el fragmento amplificado de 138 pares de bases (pb) en gel de agarosa al 2%. En cada ensayo de PCR se incluyeron los controles negativos y positivos correspondientes.



## 8.4 Amplificación cuantitativa de ADNc por PCR a tiempo real (qPCR)

Los pares de cebadores utilizados en esta tesis para amplificar las secuencias de interés se eligieron considerando que la hibridación de cada uno de ellos sea en diferentes exones para evitar amplificar ADN genómico además de ADNc, que su tamaño sea entre 50 y 250 pb, que no forme dímeros estables ( $\Delta GI \leq 6$ ) y que la temperatura de hibridación de ambos sea cercana a 60°C y no difiera más de 1°C entre ellos. El diseño y la evaluación teórica de los cebadores utilizados se realizó manualmente con la ayuda de los programas Primer-BLAST (Ye et al. 2012) y NetPrimer (PREMIERBiosoft International, <http://www.premierbiosoft.com/servlet/com.pbi.crm.clientside.FreeToolLoginServlet>). La secuencia de los cebadores empleados se indica en la Tabla 1.

Transcripto	Secuencia (5'-3')	Concentración Final (nM)
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	m $\beta$ Actina-F: GGCACCACACTTTCTACAATG	333.3
	m $\beta$ Actina-R: TGGCTGGGGTGTGAAGGT	333.3
<b>NIS</b>	mNIS-F: GCTGTGGCATTGTCATGTTC	333.3
	mNIS-R: TGAGGTCTCCACAGTCACA	333.3
<b>TG</b>	mTG-F: GAATTGCTGGCAGATGTTTCAG	333.3
	mTG-R: GGGCACTGAGCTCCTTGTAG	333.3
<b>Sec31a</b>	mSec31a-F: ATTCGGAGGGAAGTTGGTGAC	150
	mSec31a-R: TCTGAGCGGCTGAGGAAGTC	150
<b>GM130</b>	mGM130-F: CGGGATGTCCGGAAGAAAC	150
	mGM130-R: GTGTGGTCTGTGGGCACATT	100
<b>Rab1b</b>	mRab1b-F: AACGGTTCAGGACCATCACTTC	250
	mRab1b-R: TCTCACTGGCGTAGCGATCTATT	250
<b>KDEL3</b>	mKDEL3-F: GGCATCTCTGGGAAGAGTCAG	100
	mKDEL3-R: ATAGGCACACAGGAGGAAAACC	150
<b>Rab5a</b>	mRab5a-F: TTCTTCTAGGAGAGTCTGCTGTTGG	250
	mRab5a-R: CATCAAGACACACAGTTTGGGTT	150
<b>Rab7a</b>	mRab7a-F: GGAGGTGATGGTGGATGACAG	100
	mRab7a-R: GGGTTTTGAATGTGTTGGGG	75
<b>CREB3L1</b>	qRT-PCR-Creb3L1-F2: GTGAAAGAAGACCCCGTCGC	300
	qRT-PCR-Creb3L1-R2: CTCCACAGGCAGTAGAGCACC	300
<b>CREB3L2</b>	qRT-PCR-Creb3L2-F: CGGGCTCAGTCACCATTACC	100
	qRT-PCR-Creb3L2-R: CCATTTCTCACTCTCCACCTCC	100

**Tabla 1. Secuencia de los cebadores empleados en los ensayos de qRT-PCR. Se detalla la concentración usada de cada uno.**

# Mat. y Met.

El sistema utilizado para la amplificación cuantitativa a tiempo real fue el ABI7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción, los cebadores y el tamaño de los fragmentos se seleccionaron considerando eficiencias de amplificación comparables para los distintos productos. La eficiencia de amplificación se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula matemática:  $[10^{(-1/a)}]-1$  donde “a” es la pendiente de la curva estándar de cada fragmento amplificado. Los experimentos se realizaron usando 1X de la mezcla comercial de PCR (SYBR Green PCR Master Mix, Applied BioSystems), con las concentraciones de cebadores detalladas en la Tabla 1, 5  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/20 ó 1/50 de ADNc y cantidad necesaria de agua libre de ARNasas (GIBCO) para un volumen final de reacción de 15  $\mu\text{L}$ . El protocolo de ciclado empleado incluyó un paso de desnaturalización de 10 minutos a 95°C; seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y a 60°C por 1 minuto. La especificidad de la amplificación obtenida se evaluó a través del análisis de las curvas de disociación. El nivel de expresión relativa de los genes se calculó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , utilizando los transcritos de  $\beta$ -Actina como ARNm de referencia endógeno. En cada ensayo las muestras se analizaron por triplicado y se incluyeron los controles negativos necesarios.

## 9. Microscopía electrónica

Células FRTL-5 incubadas en condición basal (-TSH) o estimuladas con TSH por 24 horas (TSH) se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron durante 1 hora con solución de glutaraldehído al 1% en 0.2 M de buffer Hepes pH 7,2. Las células se lavaron 5 veces con PBS. Luego, se agregó 1 mL de PBS conteniendo 1% de BSA y las células se levantaron mecánicamente con scraper. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf y se centrifugaron a 10000 rpm por un instante. El precipitado de células se lavó 5 veces con PBS y otras 5 con agua destilada, teniendo cuidado de no resuspender las muestras. Finalmente las muestras se conservaron en 1% de glutaraldehído en 0,2 M de buffer Hepes pH 7,2.

El análisis por microscopía electrónica fue realizado en colaboración con Roman Polishchuk del Telethon Institute of Genetics and Medicine, Nápoles, Italia.

## 10. Evaluación de proliferación celular: Ensayo de captación de Bromodeoxiuridina (BrdU)

La proliferación celular se evaluó mediante el análisis de la incorporación de BrdU al ADN de células en división (en la fase S del ciclo celular). Se utilizaron placas de 24 pocillos con cubreobjetos y se crecieron células FRTL-5 en un volumen final de 1 mL de medio de cultivo. Cuando alcanzaron el 70% de confluencia, las células se privaron de TSH durante 72 horas. Luego, las células se mantuvieron en condición basal (-TSH) o se estimularon con TSH (+TSH) por 24 horas. 4 horas previas a finalizar la inducción (20 horas pos-estimulación), se

# Mat. y Met.

agregó BrdU (Molecular Probes) al medio en concentración final de 20 mM. Como control, se crecieron células FRTL-5 en medio suplementado con 5% de suero y TSH (Medio completo). Cabe recordar que el medio de las células en condición basal y de aquellas estimuladas con TSH tiene una concentración de suero de 0,2%.

Transcurridas las horas de incubación con BrdU, las células se lavaron tres veces con PBS frío y se fijaron con PBS conteniendo 3% de PFA durante 10 min. Luego de 3 lavados con PBS, las células se permeabilizaron con 0,01% de Tritón X-100 en PBS durante 10 minutos. A continuación, las células se lavaron con PBS-T y se trataron con 2 N de HCl a 37°C durante 30 minutos para desnaturalizar el ADN. Para neutralizar, se realizaron dos lavados con 0,1 M de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  pH 8,5 de 5 minutos cada uno, seguidos de tres con PBS-T. Posteriormente se realizó el bloqueo con PBS-T conteniendo 2% de BSA durante 20 minutos y se incubó con el anticuerpo monoclonal contra BrdU (Sigma-Aldrich) en una dilución 1/100 en PBS-T con 1% de BSA, durante 1 hora a 37°C. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS-T (5 minutos cada lavado) e incubaron con el anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado con Alexa Fluor 594 (Invitrogen) en una dilución 1/800 en PBS-T con 1% de BSA, durante 1 hora a 37°C. Se efectuó la coloración nuclear con Hoechst 33258 (Molecular Probes) en una dilución 1/800 en PBS, durante 15 minutos a 37°C. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS-T (5 minutos cada lavado) y los cubreobjetos se montaron en porta objetos empleando una gota de Mowiol (Calbiochem). Las muestras se conservaron a 4°C hasta el momento de su observación.

Para el análisis, se tomaron 10 fotos al azar por condición en microscopio de epi-fluorescencia Nikon Eclipse TE 2000U (CIBICI-CONICET) y se cuantificó el porcentaje de núcleos en proliferación (rojo) respecto al número de células totales (campo claro).

## 11. Análisis Estadístico

Cuando la comparación se realizó entre dos grupos, para su análisis se utilizó un test t no pareado de dos colas. Para la comparación de múltiples grupos de datos se utilizó el test paramétrico ANOVA seguido del test de comparación de Bonferroni. Y finalmente cuando se analizaron comparaciones sujetas a dos variables se utilizó el test ANOVA de dos vías seguido del post-test de Bonferroni.

Los resultados se presentan como el Valor Medio  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa GraphPadPrism 5.0 y los valores se consideraron significativamente diferentes cuando el p-valor fue menor a 0,05.

# Resultados

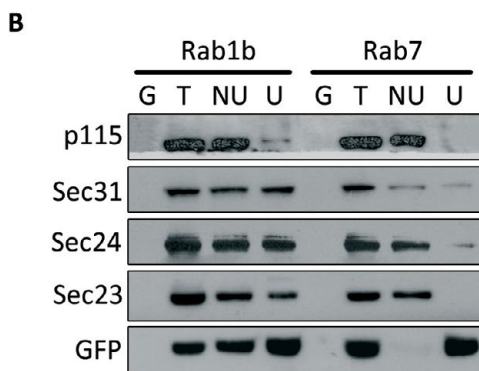
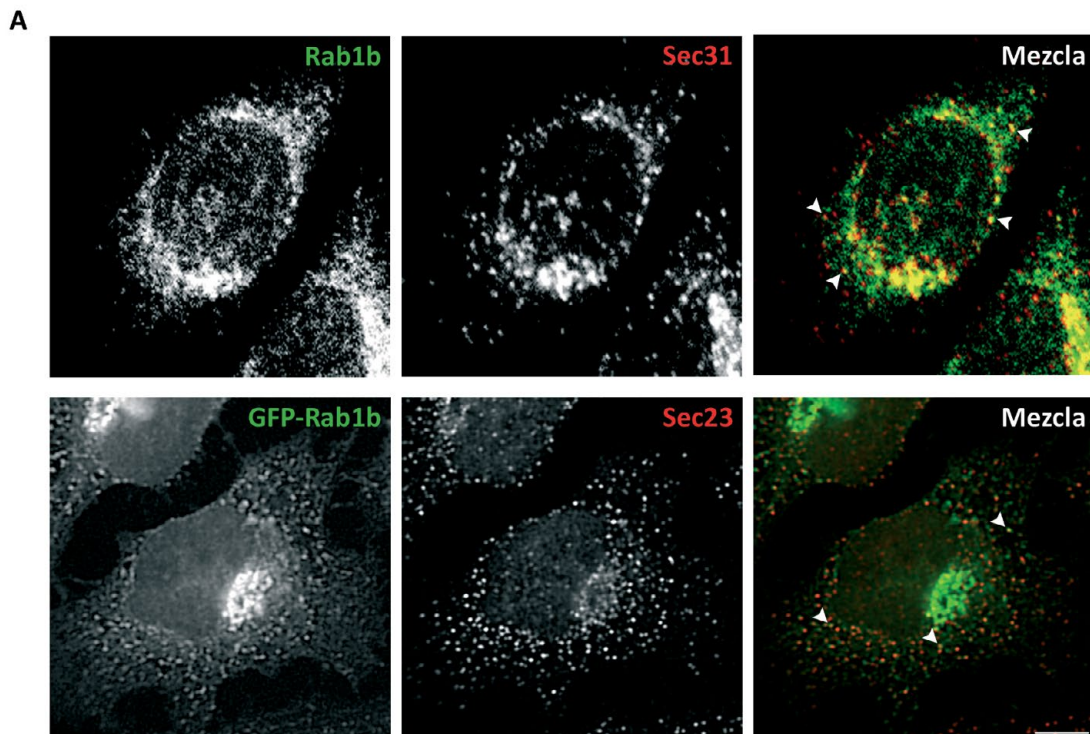
## **1- Rol de Rab1b en la dinámica y función de COPII**

### *1.1 Rab1b interacciona con componentes de COPII in vivo*

En células de mamíferos la GTPasa Rab1 se localiza en la región yuxta-nuclear y en un punteado periférico disperso en el citosol celular (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). Rab1b coordina la primera etapa de la vía secretoria, regulando el transporte y fusión de membranas en la interfase RE-Golgi, a través de la interacción con diferentes proteínas efectoras (Allan et al., 2000; Weide et al., 2001; Satoh et al., 2003; Ortiz Sandoval y Simmen, 2012; Guo y Linstedt, 2014). Considerando resultados previos obtenidos en el laboratorio que indican que Rab1b colocaliza e interacciona con componentes del complejo COPI (Monetta et al., 2007), sumado a la conexión funcional descrita entre Ypt1p (ortólogo de Rab1b) y COPII en levaduras (Tang et al., 2001; Cai et al., 2007), se planteó analizar si Rab1b interacciona con componentes COPII en células de mamíferos.

En primer lugar, se evaluó comparativamente la localización subcelular de Rab1b y componentes de COPII en células HeLa, realizando ensayos de inmunofluorescencias con anticuerpos que reconocen Rab1b y Sec31 (como marcador de COPII). Además, se llevó a cabo el mismo análisis en células HeLa transfectadas con GFP-Rab1b donde se inmunodetectó Sec23 como marcador de COPII. Las proteínas del complejo COPII se localizan en estructuras punteadas distribuidas en el citoplasma y concentradas en la zona juxta-nuclear adyacente al complejo de Golgi (Fig. 13A, paneles Sec31 y Sec23). Como fuera mencionado, Rab1b se distribuye en las membranas del complejo de Golgi y también en estructuras punteadas (Fig. 13A, panel Rab1). Se destaca que la expresión de Rab1b fusionada a GFP no altera la localización de esta GTPasa en las membranas del complejo de Golgi y en estructuras punteadas (Fig. 13A, panel GFP-Rab1). Se determinó que Rab1b colocaliza con marcadores de COPII en estructuras punteadas periféricas (Fig. 13A paneles mezcla, cabezas de flecha).

Se ha descrito que la colocalización de proteínas suele corresponderse frecuentemente con la interacción de las mismas, por lo que la colocalización de Rab1b con componentes del complejo COPII sugiere que podrían estar interactuando. Para analizar si estas proteínas interaccionan *in vivo*, se llevaron a cabo ensayos de coimmunoprecipitación. Para ello, se transfectaron células HEK293T con GFP-Rab1b o GFP-Rab7 como control, se lisaron y los extractos de proteínas resultantes se incubaron con el análogo no hidrolizable de GTP (GMP-PNP), que impide la hidrólisis de GTP, para mantener a las GTPasas en su forma activa y por lo tanto unidas a sus efectores. Luego, se realizó la inmunoprecipitación de la GFP-Rab correspondiente empleando anticuerpo monoclonal contra GFP unido covalentemente a partículas de proteína G Agarosa y la fracción unida a dichas partículas se analizó por ensayos de Western blot.



**Figura 13. Interacción de Rab1b con componentes COPII.** A. Inmunofluorescencias realizadas en células HeLa. Paneles superiores: imágenes correspondientes a los marcadores Rab1b (verde) y Sec31 (rojo) endógenos; paneles inferiores: imágenes correspondientes a los marcadores Rab1b (verde) y Sec23 (rojo) en células transfectadas con GFP-Rab1b. Las cabezas de flecha indican colocalización en estructuras punteadas. La barra representa 10  $\mu$ m. B. Ensayos de coimmunoprecipitación realizados en células HEK293T transfectadas con GFP-Rab1b o GFP-Rab7. La inmunoprecipitación se realizó empleando anticuerpo monoclonal contra GFP unido covalentemente a partículas de proteína G Agarosa y la fracción unida a las mismas se analizó por ensayos de Western blot. Para la inmunodetección se utilizaron anticuerpos policlonales contra GFP, p115, y Sec23; y monoclonales contra Sec24 y Sec31. G: Partículas de proteína G Agarosa sola. T: Extracto celular total (10%). NU: Fracción no unida (10%). U: Fracción unida a las partículas de Agarosa (100%).

Los controles realizados con GFP-Rab7, Rab asociada a endosomas tardíos, indican que la presencia de proteínas COPII en la fracción unida es prácticamente indetectable (Fig. 13B, panel Rab7). La interacción de Rab1b con p115, efector previamente descrito (Allan et al., 2000), se utilizó como control positivo del experimento (Fig. 13B, línea p115). Los resultados indican que los componentes de COPII, Sec23, Sec24 y Sec31, coimmunoprecipitan de manera específica con la forma activa de GFP-Rab1b (Fig. 13B, panel Rab1b).

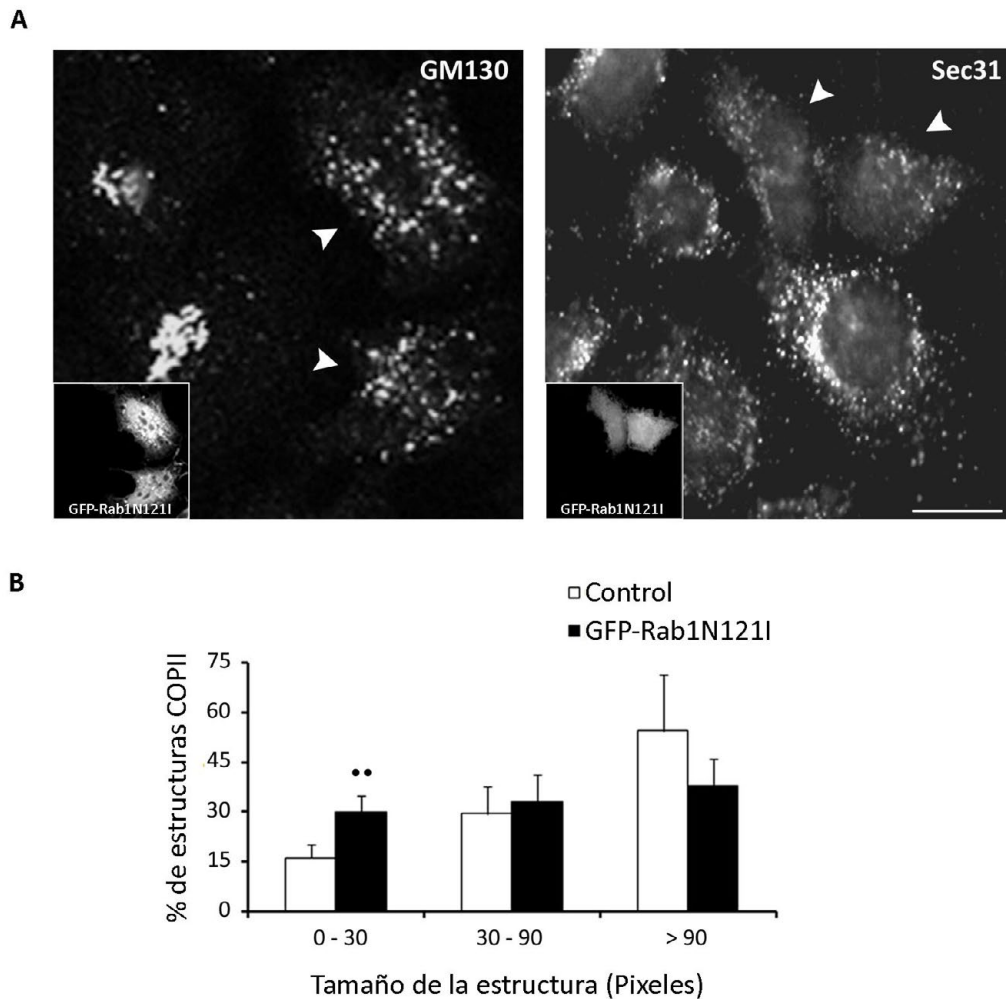
## *1.2 La inhibición de Rab1b modifica el fenotipo de COPII*

Para analizar la implicancia de la interacción de Rab1b con COPII se realizaron inmunofluorescencias empleando el marcador Sec31 en células HEK293T transfectadas con la mutante dominante negativa de Rab1b fusionada a GFP (GFP-Rab1N121I). En células HeLa, la expresión de la mutante Rab1N121I, la cual tiene baja afinidad por el nucleótido guanina, induce un fenotipo similar al que produce BFA, causando la disrupción del aparato de Golgi y la disociación del complejo COPI de las membranas (Alvarez et al., 2003).

De acuerdo con lo reportado anteriormente en células HeLa (Alvarez et al., 2003), la expresión de la mutante dominante negativa de Rab1b también induce la ruptura del complejo de Golgi en células HEK293T, lo que se observó por el patrón punteado que exhibe el marcador de Golgi GM130 (Fig. 14A, panel GM130, cabezas de flecha). A diferencia de lo que sucede con el complejo COPI, que se disocia de membranas distribuyéndose por el citosol (Monetta et al., 2007), las estructuras COPII, marcadas con Sec31, permanecen asociadas a las membranas de los ERES (representadas por estructuras punteadas distribuidas por todo el citosol; Fig. 14A, panel Sec31, cabezas de flecha). Además, las estructuras COPII presentan una disminución en la intensidad de fluorescencia, posiblemente causada por un detrimento en su tamaño o alternativamente por una menor cantidad de estructuras.

Para examinar si la inactivación de Rab1b modifica el tamaño de estructuras COPII, se analizó el tamaño de las mismas de acuerdo a la dimensión de sus píxeles, considerando tres grupos (0–30; 30–90 y >90 píxeles) y se cuantificó el número de estructuras distribuidas en cada grupo en células controles (no transfectadas) y transfectadas.

Los datos obtenidos revelaron que el número de estructuras COPII entre 0 y 30 píxeles incrementa dos veces en células que expresan Rab1N121I respecto al control, mientras que las estructuras de 30–90 o >90 píxeles no presentan diferencias significativas en ambas condiciones (Fig. 14B). Dado que el complejo de cubierta COPII constantemente se asocia y disocia de las membranas de manera dependiente de la GTPasa Sar1 (Figura 4 Introducción), es probable que la disminución del tamaño detectada sea consecuencia de una modificación en la dinámica de asociación/disociación inducida por la inactivación de Rab1b.



**Figura 14. Efecto de la inhibición de la actividad de Rab1b sobre COPII.** A. inmunofluorescencias realizadas en células HEK293T transfectadas con GFP-Rab1N121 (36 horas) marcadas contra GM130 o Sec31. Los recuadros muestran las células que expresan GFP-Rab1N121, marcadas contra GFP. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ . B. Cuantificación de la distribución del tamaño de estructuras COPII. Se analizaron las estructuras punteadas de 20 células empleando el programa ImageJ y se clasificaron en tres grupos según el tamaño de sus píxeles: 0–30, 30–90 y >90 píxeles. El gráfico de barras representa el porcentaje promedio del número de estructuras de cada tamaño (transfectadas o no con Rab1N121)  $\pm$  DE. El número total de estructuras COPII en cada condición se consideró el 100%. ( $\bullet\bullet = p < 0,001$ ).

### 1.3 Rab1b modula la dinámica de asociación/disociación de COPII a membranas

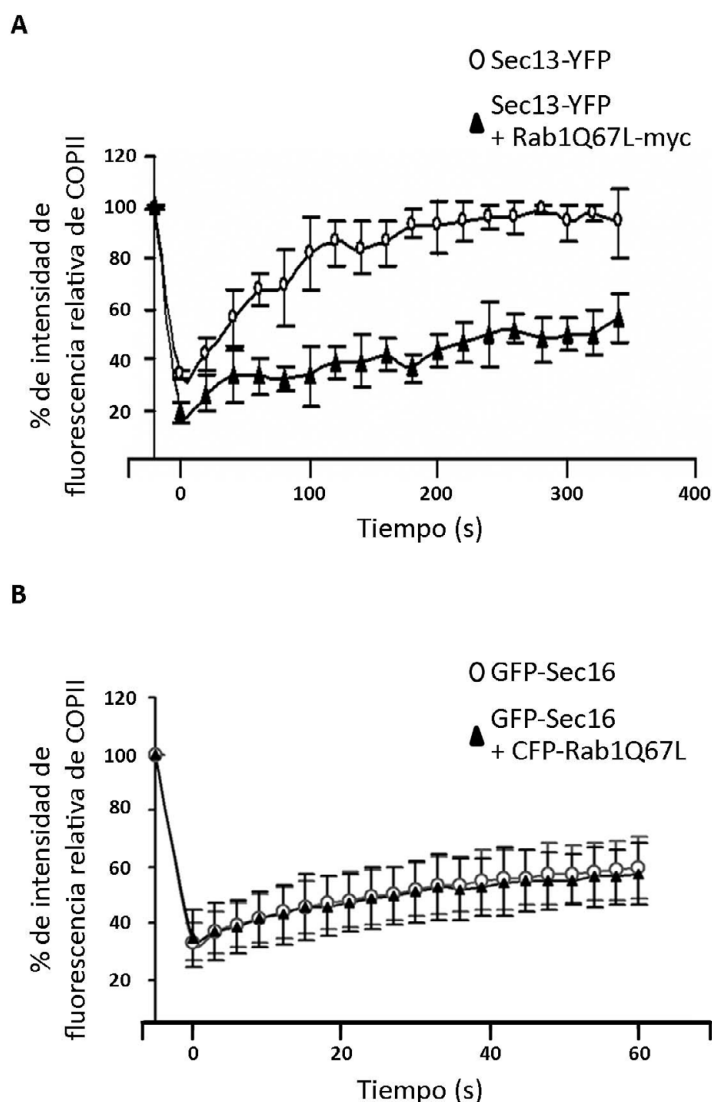
El fenotipo celular inducido por la mutante Rab1N121I es similar al generado por el tratamiento con BFA. BFA induce la disociación de COPI de membranas sin modificar la asociación de COPII, ni su dinámica de asociación/disociación (Ward et al., 2001). La inactivación de Rab1b también provoca la disociación de COPI de membranas, pero a diferencia de BFA, causa reducción en el tamaño de estructuras COPII (Fig. 14), lo que sugiere la posibilidad de que Rab1b esté modulando la dinámica de asociación/disociación de COPII a membranas.



# Res. I

Para analizar esta posibilidad, se realizaron ensayos de recuperación de fluorescencia de Sec13-YFP después del fotoblanqueado (FRAP) en células HeLa transfectadas con Sec13-YFP o cotransfectadas con Sec13-YFP y la mutante activa de Rab1b unida a una etiqueta de myc (Rab1Q67L-myc). Esta mutación bloquea la actividad GTPasa intrínseca estabilizando a las proteínas Rab en su forma activa, unida a GTP y manteniéndolas asociadas a las membranas.

En células que expresan sólo Sec13-YFP, se observó que el área fotoblanqueada recupera el 100% de la intensidad inicial de fluorescencia de Sec13-YFP a lo largo del tiempo del experimento (con  $t_{1/2} \sim 45$  s; Fig. 15A). Contrariamente, en células que co-expresan Sec13-YFP y Rab1Q67L-myc, sólo se recupera el  $\sim 40\%$  de la intensidad inicial de fluorescencia de Sec13-YFP a lo largo del tiempo analizado (Fig. 15A). Estos resultados indican que la velocidad de asociación/disociación de COPII a las membranas se modifica en presencia de la mutante activa de Rab1b. Estos datos difieren de los resultados publicados por Haas y colaboradores que muestran que la dinámica de COPII no cambia luego de la inhibición de Rab1b por la expresión de su GAP, TBC1D2 (Haas et al., 2007). Esta diferencia puede estar



**Figura 15. Dinámica de asociación/disociación de COPII.** Cuantificación de la dinámica de recuperación de la intensidad de fluorescencia relativa de estructuras COPII luego del fotoblanqueado en células que expresan (A) Sec13-YFP (○) o coexpresan Sec13-YFP y Rab1Q67L-myc (▲), (B) GFP-Sec16 (○) o coexpresan GFP-Sec16 y CFP-Rab1Q67L (▲). La intensidad de fluorescencia de la región de interés se relativizó con la intensidad de una región de referencia. Se analizaron 15 - 16 células.

# Res. I

dada por el hecho de que el análisis fue realizado usando el marcador de COPII Sec16, que actúa previamente a Sar1 (Bhattacharyya y Glick, 2007; Ivan et al., 2008). Para analizar el efecto de Rab1b en la dinámica de Sec16, se realizaron ensayos de FRAP en células que expresan GFP-Sec16 y en células que coexpresan GFP-Sec16 y CFP-Rab1Q67L. En células que expresan GFP-Sec16, se observó que se recupera ~65% de la fluorescencia inicial de GFP-Sec16 (con  $t_{1/2} \sim 15$  s; Fig. 15B). La dinámica de recuperación de fluorescencia fue similar en células que coexpresan GFP-Sec16 y CFP-Rab1Q67L (Fig. 15B). En conjunto, estos resultados sugieren que los componentes de COPII que actúan río abajo de Sec16 podrían ser estabilizados en las membranas por la proteína Rab1b en su forma activa.

## 1.4 Conclusiones Capítulo I

Rab1b colocaliza e interacciona en su forma activa con componentes COPII. Se corroboró que la interacción ocurre *in vivo*.

Por otra parte, la inhibición de la actividad de Rab1b, causada por la expresión de la mutante dominante negativa (Rab1N121I), reduce el tamaño de las estructuras punteadas de COPII.

Rab1b modula la dinámica de asociación/disociación de COPII a membranas.

## 2- Cambios moleculares y estructurales en células tiroideas en respuesta a TSH:

Los órganos secretores deben adaptarse a las variaciones en la demanda de secreción de proteínas que ocurre durante el desarrollo, diferenciación, o cambios en las condiciones fisiológicas. Sin embargo, una pregunta muy importante, que hasta el momento no ha sido del todo esclarecida, es: ¿cómo las células se adaptan al aumento de la capacidad secretora para permitir una correcta expresión, plegado, modificación y transporte de los productos secretados?.

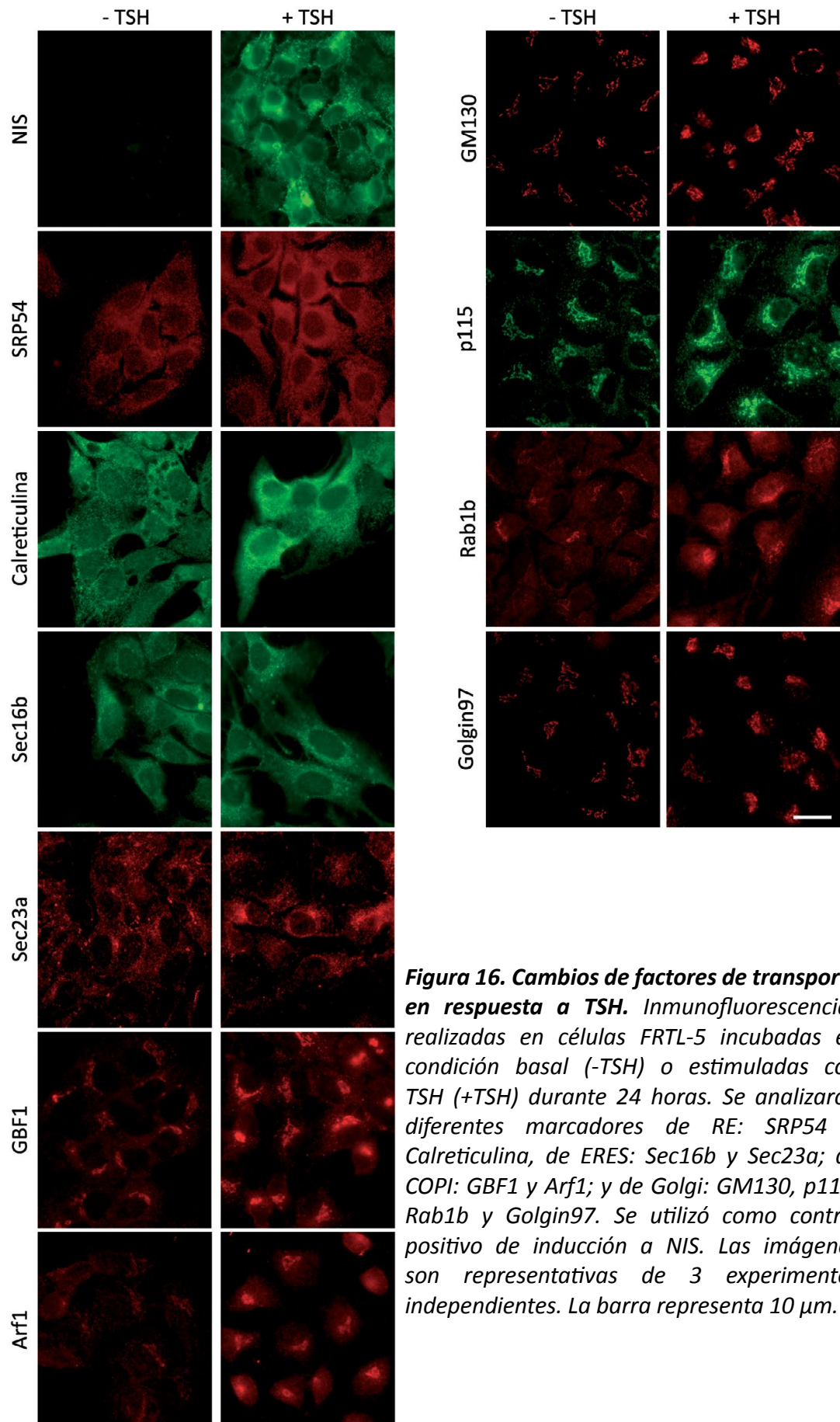
Para estudiar los mecanismos que regulan la capacidad secretora se utilizó como modelo secretor y respondedor a un estímulo específico la línea celular derivada de tiroides de rata, FRTL-5. Como se explicó anteriormente, en estas células el estímulo con TSH induce la síntesis de proteínas (necesarias para la producción de las hormonas tiroideas) que requieren de la vía secretora para alcanzar su correcto destino y así poder llevar a cabo adecuadamente su función.

### *2.1 TSH incrementa los niveles proteicos de factores de transporte*

Para determinar el efecto del estímulo con TSH sobre proteínas que participan en diferentes etapas de la vía secretora, se realizaron inmunofluorescencias en células FRTL-5 incubadas en condición basal (-TSH) o estimuladas con 1mU/mL de TSH (+TSH) durante 24 horas y se analizaron marcadores de diferentes estructuras que participan en la primera etapa de transporte de la vía secretora (RE-Golgi). Como marcadores de RE se analizaron SRP54 y Calreticulina; como marcadores de ERES se analizaron las subunidades de COPII Sec16b y Sec23a; como marcadores de COPI se analizaron GBF1 y Arf1; y como marcadores de Golgi se analizaron GM130, p115, Rab1b y Golgin97;. Además, se consideró la expresión de NIS (simportador de Sodio/Ioduro) en respuesta a TSH como control positivo de funcionamiento del sistema. De aquí en adelante se hará referencia a las proteínas que integran la maquinaria de transporte de membranas como “factores de transporte”.

Los resultados indican que, en ausencia de estímulo, los niveles de NIS son prácticamente indetectables, mientras que después de 24 horas de estimulación con TSH, se detectó una marcada inducción de la expresión de NIS, que se localiza en membrana plasmática (Fig. 16, paneles NIS). Además, se observó una mayor intensidad de fluorescencia de la mayoría de los factores de transporte analizados (Fig. 16, paneles +TSH), respecto a la condición basal (Fig. 16, paneles -TSH). Se destaca que, todos los marcadores analizados presentaron una correcta distribución subcelular en ambas condiciones y en la condición basal se detectó expresión de todas las proteínas en estudio (Fig. 16, paneles -TSH).

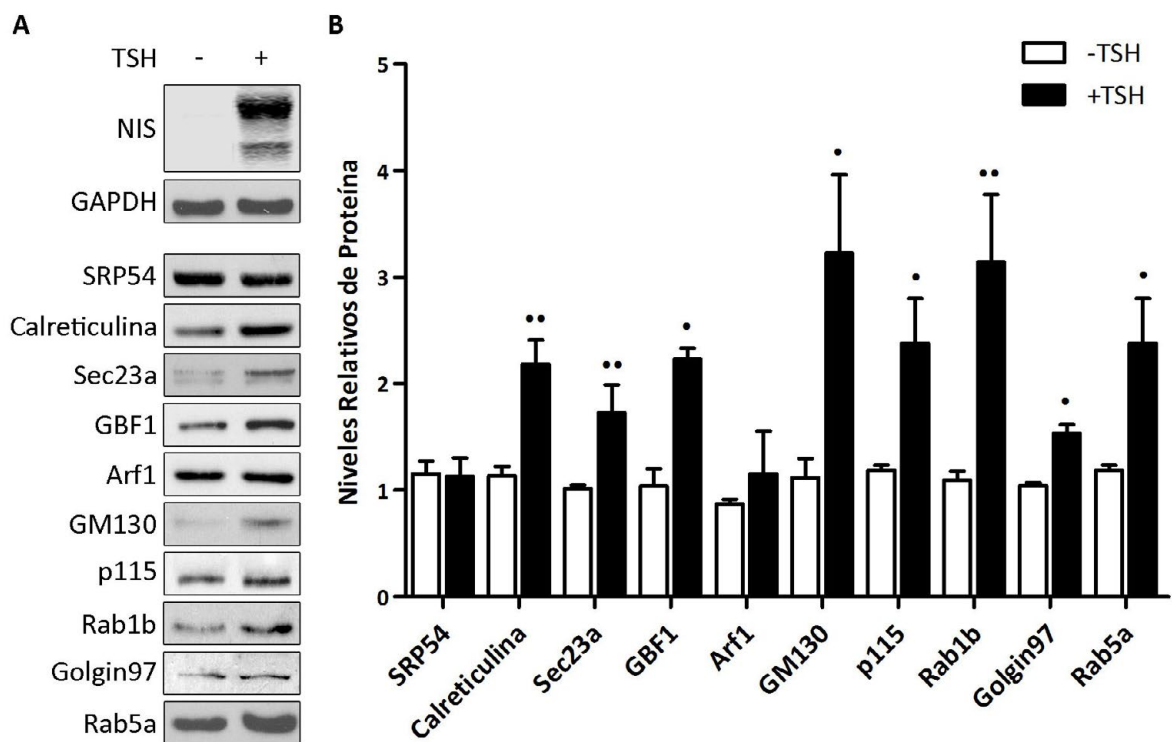
## Res. II



**Figura 16. Cambios de factores de transporte en respuesta a TSH.** Inmunofluorescencias realizadas en células FRTL-5 incubadas en condición basal (-TSH) o estimuladas con TSH (+TSH) durante 24 horas. Se analizaron diferentes marcadores de RE: SRP54 y Calreticulina, de ERES: Sec16b y Sec23a; de COPI: GBF1 y Arf1; y de Golgi: GM130, p115, Rab1b y Golgin97. Se utilizó como control positivo de inducción a NIS. Las imágenes son representativas de 3 experimentos independientes. La barra representa 10  $\mu$ m.

## Res. II

Para cuantificar los cambios observados por inmunofluorescencias, se realizaron ensayos de Western blot comparando los niveles de proteínas en ausencia y presencia de TSH (Fig.17). Luego de 24 horas de inducción con TSH, se detectaron mayores niveles proteicos en gran parte de los factores de transporte analizados (Fig.17A). Las proteínas Sec23a y Golgin97 incrementaron sus niveles 1,5 veces con el tratamiento; Calreticulina, GBF1 y p115 lo hicieron ~2 veces; mientras que los niveles de GM130 y Rab1b aumentaron más de 3 veces (Fig.17B). Por su parte, Arf1 y SRP54 no mostraron cambios significativos (Fig.17B). Los niveles de GAPDH se mantuvieron constantes en ambas condiciones, considerándose control de carga del experimento (Fig.17A). Nuevamente, NIS se estableció como control del correcto funcionamiento del sistema (Fig.17A). Además, se evaluó el marcador de



**Figura 17. Niveles relativos de factores de transporte en respuesta a TSH.** A. Ensayos de Western blot representativos realizados con extractos totales de células FRTL-5 incubadas en condición basal (-TSH) o estimuladas con TSH (+TSH) durante 24 horas. Se utilizaron anticuerpos contra los marcadores de RE: SRP54 y Calreticulina; de ERES: Sec23a; de COPI: GBF1 y Arf1; de Golgi: GM130, p115, Rab1b y Golgin97; y de endosomas tempranos: Rab5a. NIS se empleó como control positivo de inducción, y GAPDH, como control de carga. Para la detección se utilizó el reactivo de quimioluminiscencia ECL con exposición en placa radiográfica. B. Cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas indicadas, normalizada con la intensidad de GAPDH y relativa a la condición control (-TSH), donde la relación se consideró igual a 1. Las barras representan la media  $\pm$  EEM (error estándar de la media) de los resultados obtenidos de al menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado, los cuales se analizaron mediante el test de student y se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,001$ ). La cuantificación se realizó empleando el software GelPro31.

## Res. II

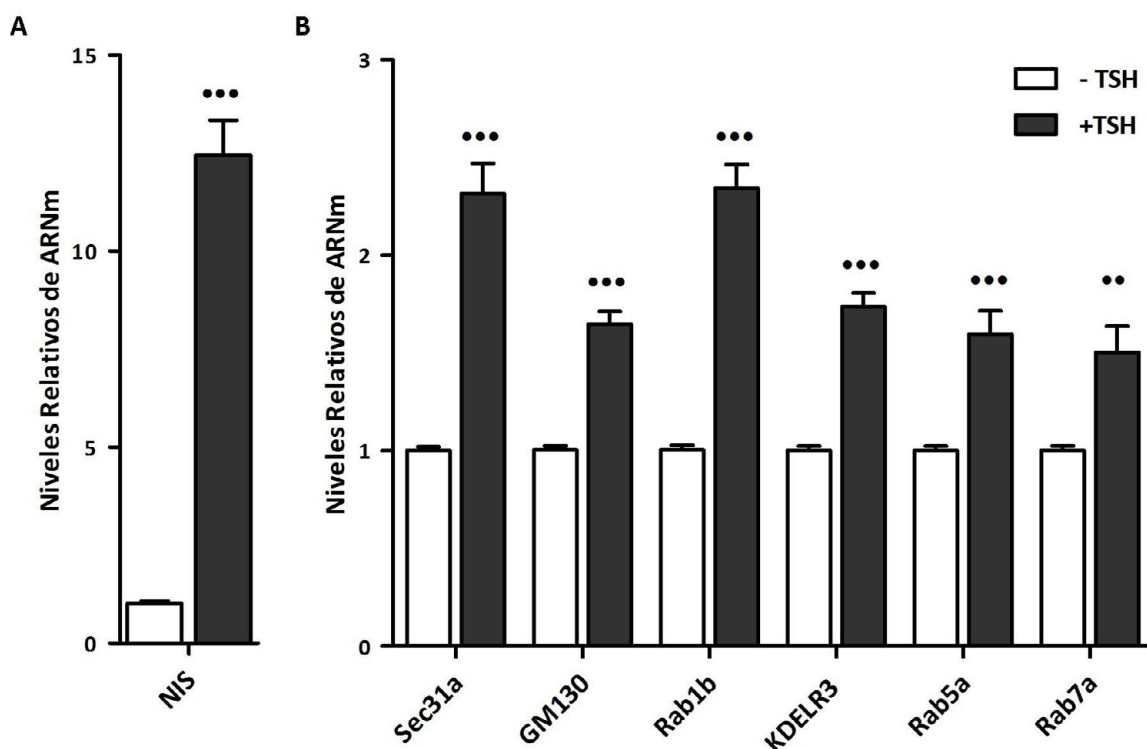
endosomas tempranos Rab5a y se observó que los niveles de esta proteína incrementan más de 2 veces en respuesta a TSH (Fig.17A y B). Los cambios observados concuerdan con datos anteriormente publicados (Croizet-Berger et al., 2002). La vía endocítica es esencial para la endocitosis y procesamiento intracelular de TG en la producción de hormonas tiroideas (Marinò y McCluskey, 2000), por lo que es de esperar que también responda a TSH. En conjunto, estos resultados (Fig. 16 y 17) indican que los niveles proteicos de la mayoría de los factores de transporte analizados incrementan en respuesta a un estímulo secretor.

### *2.2 TSH incrementa los niveles de transcritos de genes que codifican a factores de transporte*

Con el propósito de determinar si los cambios en los niveles de proteína observados en respuesta a TSH están dados por un incremento en los niveles de transcritos de dichos genes, se realizaron ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Para ello, se evaluaron los niveles relativos de ARNm de células FRTL-5 incubadas en condición basal (-TSH) o estimuladas con TSH (+TSH) durante 14 horas. Se analizaron los transcritos correspondientes a los marcadores de COPII: Sec31a; de Golgi: GM130, Rab1b y KDELR3; y de endosomas: Rab5a y Rab7a. Nuevamente NIS se utilizó como control positivo del funcionamiento del sistema (Fig. 18A).

Se determinó que, en acuerdo con lo observado a nivel de proteínas, los niveles de ARNm de genes que participan en transporte son mayores en células estimuladas con TSH, que en la condición basal (Fig. 18B). Los niveles relativos de ARNm aumentaron entre ~1,5 veces, en el caso de GM130, KDELR3, Rab5a y Rab7a, y ~2,5 veces, en el caso de Sec31a y Rab1b. Estos resultados sugieren que el incremento observado en los niveles proteicos de factores de transporte causado por TSH está dado por incremento de la transcripción de los genes que codifican a los mismos.

Se destaca que prácticamente todos los marcadores detectados por inmunofluorescencias se analizaron por ensayos de Western blot, con la salvedad de Sec16b y Rab5a que no pudieron ser detectados por ensayos de Western blot e inmunofluorescencia, respectivamente, en las condiciones ensayadas. Por otra parte, en el análisis por qRT-PCR se incluyeron Sec31a, KDELR3 y Rab7a cuyos niveles proteicos no pudieron ser determinados por limitaciones experimentales. Además, los cebadores diseñados para la amplificación de Calreticulina y Sec23a no fueron eficientes, ya que en ambos casos se amplificaron productos de PCR inespecíficos, por lo que no pudieron valorarse por qRT-PCR.

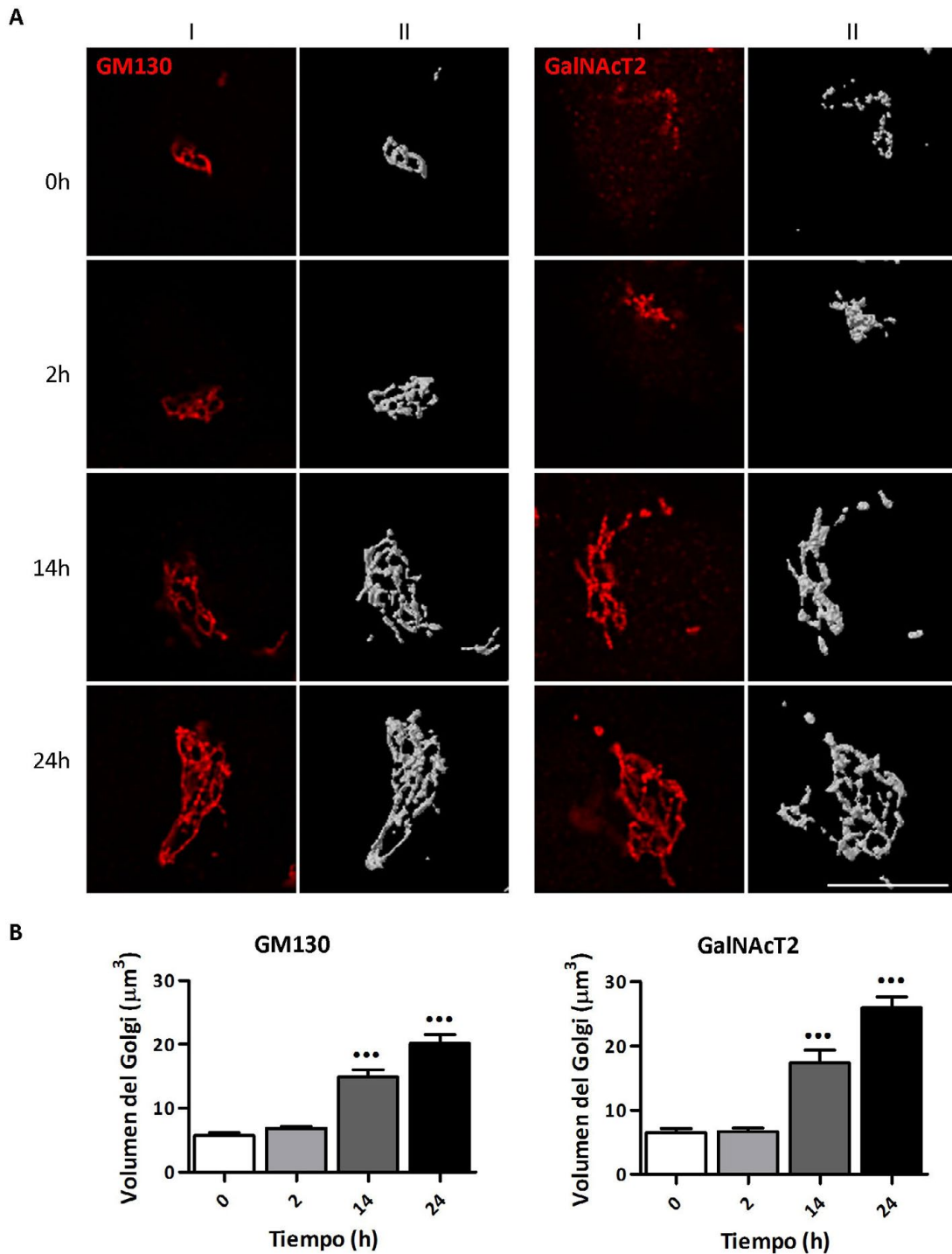


**Figura 18. Niveles relativos de ARNm de genes que codifican a factores de transporte en respuesta a TSH.** Se determinaron los niveles de ARNm mediante transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real (qRT-PCR), a partir de ARN total de células FRTL-5 incubadas en condición basal (-TSH) o estimuladas con TSH (+TSH) durante 14hs. Los fragmentos de los genes de interés se amplificaron empleando cebadores específicos con el equipo ABI 7500 de Applied Biosystems. Los datos se normalizaron considerando  $\beta$ -Actina como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , usando como calibrador para cada gen el nivel de ARNm obtenido de extractos de la condición basal (-TSH). A. Niveles de ARNm relativos de NIS. B. Niveles de ARNm relativos de marcadores de ERES: Sec31a; de Golgi: GM130, Rab1b y KDELR3; y de endosomas: Rab5a y Rab7a. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de los resultados obtenidos de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, los cuales se analizaron mediante el test de student y se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (•••=p < 0.0001).

### 2.3 TSH incrementa el volumen del complejo de Golgi

Los resultados indican que TSH incrementa los niveles de transcritos y proteínas de factores de transporte y considerando que la mayoría de marcadores analizados pertenecen al aparato de Golgi, se evaluó si la inducción con TSH también promueve cambios morfológicos en el complejo de Golgi. Con tal fin, se realizaron inmunofluorescencias en células FRTL-5 incubadas en condición basal (0h) o estimuladas con TSH durante diferentes tiempos (2, 14 y 24h), empleando dos marcadores de Golgi, una proteína de matriz de Golgi, GM130; y una proteína transmembrana GalNAcT2, que presenta actividad enzimática





**Figura 19. Efecto de TSH sobre el complejo de Golgi.** A.I. Imágenes deconvolucionadas de inmunofluorescencias de células FRTL-5 no estimuladas (0h) o estimuladas con TSH durante las horas indicadas, utilizando los marcadores GM130 o GalNAcT2. A.II. Reconstrucciones 3-D de las imágenes mostradas en A.I. La barra representa 10 µm. B. Cuantificación del volumen del complejo de Golgi en relación al tamaño celular (determinado por citometría de flujo y considerado 1 en el tiempo 0). Las barras representan la media ± EEM de los resultados obtenidos de 2 experimentos independientes donde se examinaron 14-17 células por condición. Los datos se analizaron mediante el test ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, considerándose estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (•••=p < 0.0001). La deconvolución especial, la reconstrucción 3-D y la cuantificación se realizaron con el Software Huygens Essential.

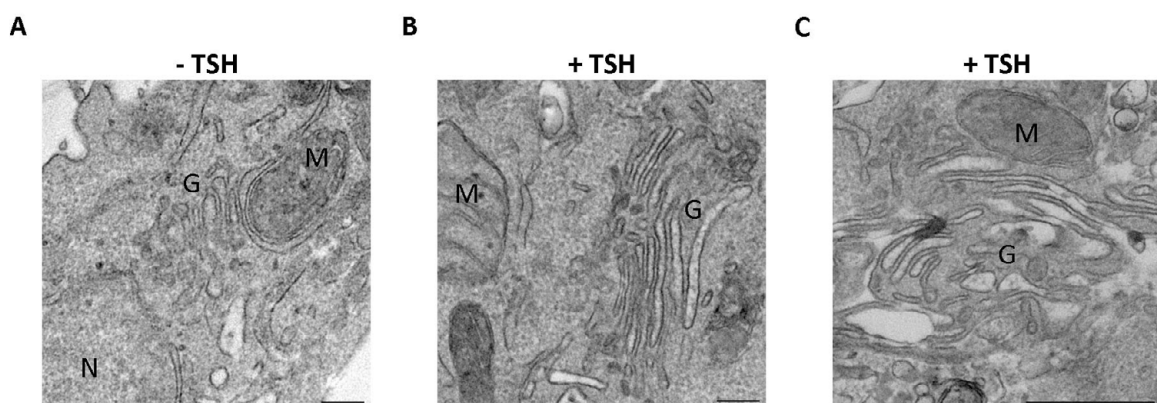


## Res. II

catalizando la transferencia de grupos N-Acetil-Galactosamina a proteínas cargo. Se detectó un importante incremento en el tamaño del Golgi entre las 2 y las 14 horas de tratamiento (Fig. 19A, paneles I). Dicho efecto se percibió con los dos marcadores analizados, GM130 y GalNAcT2.

Para cuantificar los cambios observados se empleó el software Huygens Essential para deconvolucionar espacialmente las imágenes y obtener las reconstrucciones tridimensionales de las mismas, a partir de las cuales se determinó el volumen del Golgi (Fig. 19A, paneles II). Los resultados obtenidos fueron similares para los dos marcadores evaluados. Se halló que TSH promueve el aumento significativo del volumen del Golgi, a partir de las 14 horas de inducción (Fig. 19B) siendo  $\sim 3$  veces mayor respecto a su tamaño en la condición basal (Tiempo 0) y  $\sim 4$  veces más grande luego de 24 horas de inducción (Fig. 19B). Cabe aclarar que, en cada tiempo los valores obtenidos del volumen del Golgi se dividieron por el tamaño celular aparente, el cual se determinó por citometría de flujo y se consideró 1 al tamaño de las células en el tiempo 0h. De este modo, los cambios indicados se independizan de variaciones en el volumen celular. Se destaca que el tamaño celular no varía significativamente entre las distintas condiciones ensayadas.

Con el objetivo de establecer los cambios ultraestructurales que ocurren a nivel del complejo de Golgi en respuesta a TSH, se realizaron ensayos de microscopía electrónica en células FRTL-5 no estimuladas (-TSH) o estimuladas con TSH (+TSH) durante 24 horas. Para ello, se estableció una colaboración con Roman Polishchuk del Telethon Institute of Genetics and Medicine, Nápoles, Italia.



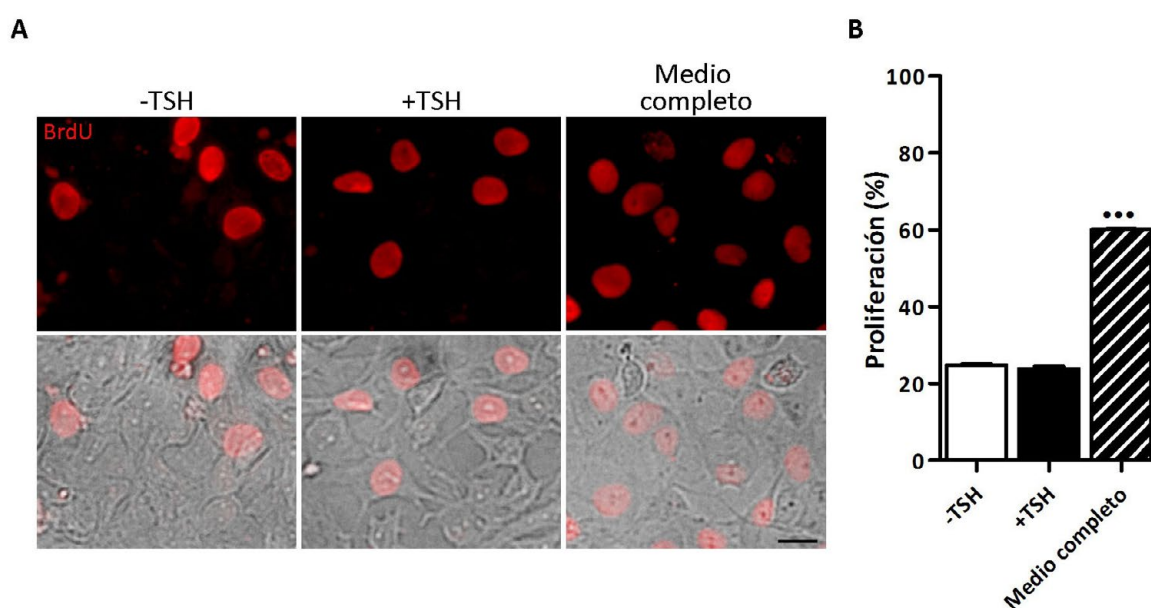
**Figura 20. Análisis ultraestructural del complejo de Golgi en respuesta a TSH.** Micrografías electrónicas de células FRTL-5 (A) incubadas en condición basal (-TSH) o (B y C) estimuladas con TSH (+TSH) por 24 horas. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. N: Núcleo; M: Mitocondria; G: Golgi. La barra representa 500 nm.

## Res. II

Los resultados revelan que, en condición basal hay una distribución normal de las distintas organelas celulares, donde el complejo de Golgi presenta su usual organización en cisternas (Fig. 20A). Por otra parte, en células estimuladas con TSH se determinó un incremento en el número de cisternas del aparato de Golgi, observándose de 1 a 2 más por stack (Fig. 20B). Además, se encontró que las cisternas presentan una mayor dilatación, lo que apunta a que probablemente presentan mayor superficie (Fig. 20C). Estos resultados sugieren que el aumento del volumen del Golgi en respuesta al estímulo con TSH se debe a la presencia de un mayor número de cisternas y a una mayor dilatación de las mismas.

### 2.4 TSH no induce proliferación de células FRTL-5 luego de 24 horas de tratamiento

TSH suele ser considerado un mitógeno fisiológico específico que promueve la división celular de tirocitos (FRTL-5), ya que estimula el crecimiento, el funcionamiento y la diferenciación de células tiroideas (Dumont et al., 1992). El efecto de TSH sobre la proliferación celular de FRTL-5 es dependiente de las condiciones de incubación.



**Figura 21. Proliferación celular en respuesta a TSH.** A. En el panel superior se muestran imágenes de inmunofluorescencias realizadas en células FRTL-5 no estimuladas (-TSH), estimuladas con TSH (+TSH) o incubadas en medio completo (5% de suero y TSH) durante 24 horas, utilizando anticuerpo contra BrdU. En el panel inferior se muestra la superposición de fotografías de contraste de fase y de fluorescencia. La barra representa 10 μm. B. Cuantificación del porcentaje de células en proliferación, es decir, BrdU positivas. Las barras representan la media ± EEM de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes donde se examinaron 15 campos por condición. Los datos se analizaron mediante el test ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, considerándose estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*\*\*=p < 0.0001).

## Res. II

Con el fin de corroborar si en las condiciones empleadas en nuestro sistema los cambios observados hasta el momento son consecuencia de mayor proliferación celular, se procedió a evaluar el efecto mitogénico de TSH. Para ello se utilizó Bromodeoxiuridina (BrdU), nucleótido sintético análogo a la timidina, el cual se incorpora al núcleo de células en fase de síntesis. Si TSH induce proliferación, se detectará incremento en la incorporación de BrdU en las células. Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, empleando un anticuerpo específico contra BrdU, en células FRTL-5 incubadas en presencia de BrdU, no estimuladas (-TSH) o estimuladas con TSH (+TSH) durante 24 horas. Como control positivo, se crecieron células FRTL-5 en medio suplementado con 5% de suero y TSH (medio completo). Cabe reiterar (ver materiales y métodos) que la concentración de suero en el medio de incubación es de 0.2%, tanto en células no estimuladas como estimuladas con TSH.

El porcentaje de células en proliferación en cada condición analizando el número de núcleos conteniendo BrdU en relación al número total, indicó que la proporción de células en fase de síntesis luego del estímulo con TSH no varía respecto a la condición basal (Fig. 21). Contrariamente, cuando las células se incubaron en medio suplementado con 5% de suero y TSH el porcentaje de núcleos que incorporaron BrdU es mayor que en las otras dos condiciones (Fig. 21, medio completo). Estos resultados indican que, en las condiciones ensayadas TSH no induce proliferación de células FRTL-5, al menos en las primeras 24 horas de tratamiento. Datos presentados por Grieco y colaboradores (Grieco et al., 1990) sostienen que recién luego de 36 horas del estímulo con TSH se observa la mayor tasa de proliferación de tirocitos.

### *2.5 Conclusiones Capítulo II*

El estímulo con TSH promueve el incremento de la expresión de genes que codifican para factores de transporte, con un concomitante aumento en sus niveles proteicos.

Estos cambios moleculares impactan estructuralmente en una de las principales organelas que integran la vía secretoria: el complejo de Golgi, el cual amplía su volumen extendiendo el número de cisternas y la superficie de las mismas en respuesta a TSH.

Los cambios observados son independientes de la división celular ya que TSH no promueve la proliferación de células FRTL-5 en las condiciones ensayadas

## **3- Mecanismos que regulan cambios en los factores de transporte en respuesta a TSH**

Los mecanismos que regulan los cambios descritos en el capítulo anterior pueden explicarse por dos vías diferentes:

1) TSH estimula la síntesis de proteínas específicas de tiroides (como NIS, Tiroperoxidasa (TPO) y Tiroglobulina (TG), consideradas proteínas cargo) que inducen sobrecarga del transporte e indirectamente promueven el incremento de factores de transporte, regulando así la capacidad secretoria. Es decir, es el aumento de cargo/tráfico lo que lleva a cambios en la maquinaria de transporte;

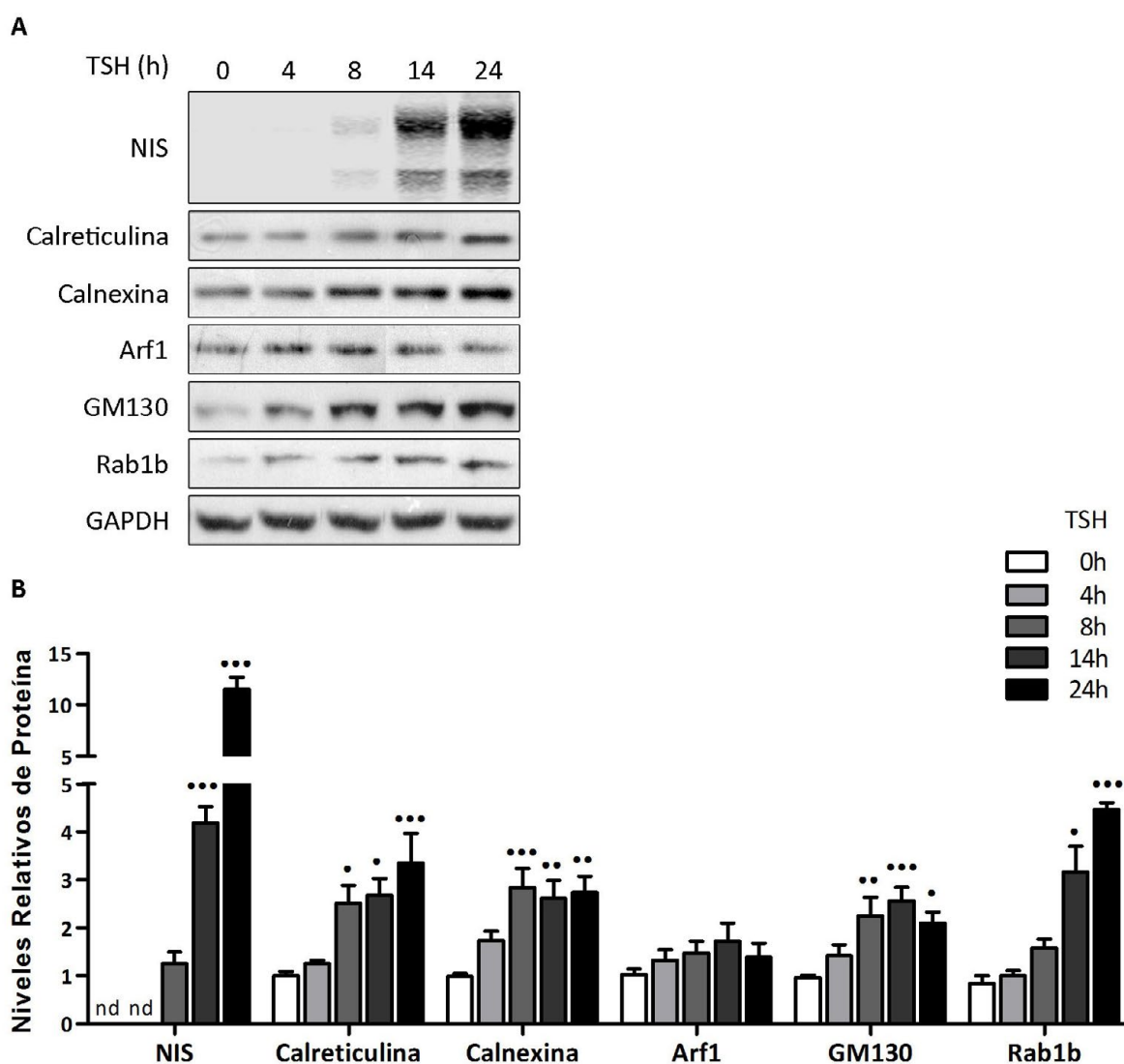
2) TSH activa directamente vías de señalamiento que regulan simultáneamente la producción de cargo específico y la expresión de factores de transporte, ampliando la capacidad secretoria de estas células. Es decir, el aumento de cargo/tráfico y los cambios en la maquinaria de transporte ocurren paralelamente.

A continuación se describen resultados orientados a esclarecer las dos hipótesis posibles.

### *3.1 La cinética de expresión de proteínas de transporte en función a TSH es similar a la de NIS*

Para abordar la primer hipótesis se hizo referencia al trabajo de Christis y colaboradores (Christis et al., 2010), quienes, empleando el modelo celular FRTL-5, plantean que TG es “un cliente demandante” del RE ya que, una vez que su síntesis es activada por el estímulo con TSH, requiere de la asistencia de muchas chaperonas del RE y enzimas de plegado para su correcto transporte. Sin embargo, revelaron que el incremento de los niveles de TG en respuesta a TSH no genera acumulación de esta proteína en el RE. En su lugar, observaron que chaperonas del RE y enzimas de plegado alcanzan su tasa máxima de síntesis inmediatamente después de la estimulación con TSH, antes que haya un aumento significativo de los niveles de TG. El incremento resultante de la capacidad de plegado es previo a la producción de la proteína cargo. Esto previene el estrés celular causado por acumulación de proteínas no plegadas, confirmado por la falta de activación de componentes clásicos de la vía que responde a proteínas no plegadas (UPR). Si bien estos autores pudieron determinar que la inducción con TSH no genera estrés de RE (al menos no el estrés clásico, conocido hasta el momento), no indagan sobre el mecanismo molecular que lleva al incremento de proteínas residentes del RE y el consecuente aumento en la capacidad de plegado de proteínas.

Para establecer si los cambios observados en los factores de transporte son consecuencia del incremento de cargo/tráfico, se comparó la cinética de expresión de proteínas de transporte en relación a la de una proteína cargo (en nuestros experimentos se analizó NIS). Para ello, se realizaron ensayos de Western blot con extractos totales provenientes



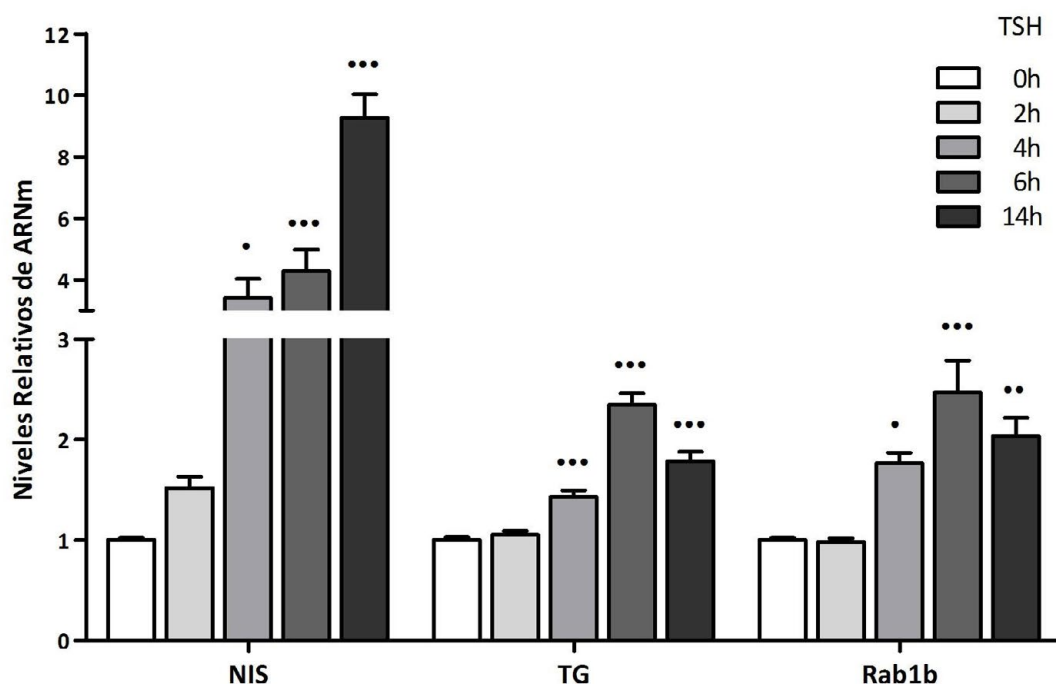
**Figura 22. Cinética de expresión de proteína cargo y de factores de transporte en respuesta a TSH.** A. Ensayos de Western blot representativos realizados con extractos totales de células FRTL-5 no estimuladas (0h) o estimuladas con TSH durante los tiempos indicados. Se utilizaron anticuerpos contra proteína cargo: NIS, los marcadores de RE: Calreticulina y Calnexina; de COPI: Arf1; y de Golgi: GM130 y Rab1b. GAPDH se empleó como control de carga. Para la detección se utilizó el reactivo de quimioluminiscencia ECL con exposición en placa radiográfica. B. Cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas indicadas, normalizada con la intensidad de GAPDH y relativa a la condición control (0h), donde la relación se consideró igual a 1. Debido a que NIS no es detectable en la condición control, los valores se relativizaron a la condición 8h. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de los resultados obtenidos de al menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado, los cuales se analizaron mediante el test ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, considerándose estadísticamente significativo un  $p$ -valor  $< 0,05$  ( $\bullet = p < 0,05$ ;  $\bullet\bullet = p < 0,001$ ;  $\bullet\bullet\bullet = p < 0,0001$ ). nd: no detectable. La cuantificación se realizó empleando el software GelPro31.

## Res. III

de células FRTL-5 estimuladas durante diferentes tiempos con TSH (0, 4, 8, 14 y 24h) y se determinaron los niveles proteicos de diferentes factores de transporte paralelamente a los niveles de NIS.

Se observó que, luego de 8 horas de tratamiento con TSH la expresión de NIS es prácticamente indetectable, distinguiéndose una marcada inducción de su expresión a las 14 horas y presentando mayores niveles a las 24 horas de estímulo (Fig. 22A y B). Por su parte, los niveles proteicos de factores de transporte aumentaron gradualmente a lo largo de todo el periodo de inducción evaluado (Fig. 22A y B), a excepción de Arf1 que si bien muestra un pequeño cambio, el mismo no fue significativo.

Además, se examinaron los niveles de ARNm de genes que codifican al factor de transporte Rab1b y a proteínas cargo (NIS y TG), a distintos tiempos de inducción con TSH.



**Figura 23. Cinética de expresión de transcritos que codifican a proteínas cargo y al factor de transporte Rab1b en respuesta a TSH.** Niveles relativos de ARNm determinados mediante transcripción reversa seguida de qRT-PCR, a partir de ARN total de células FRTL-5 no estimuladas (0h) o estimuladas con TSH por 2, 4, 6 y 14 horas. Los genes de NIS, TG y Rab1b se amplificaron empleando cebadores específicos con el equipo ABI 7500 de Applied Biosystems. Los datos se normalizaron considerando  $\beta$ -Actina como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , usando como calibrador para cada gen el nivel de ARNm obtenido en la condición basal (0h). Las barras representan la media  $\pm$  EEM de los resultados obtenidos de al menos 3 experimentos independientes realizados por triplicado, los cuales se analizaron mediante el test ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, considerándose estadísticamente significativo un  $p$ -valor  $< 0,05$  (\*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,001$ ; \*\*\*= $p < 0,0001$ ).

## Res. III

En este análisis se incluyó a TG y los datos obtenidos muestran que su expresión presenta una cinética similar a la de NIS en respuesta a TSH (Fig. 23).

Los resultados indican que la cinética de los cambios en los niveles de ARNm, tanto de genes cargo como de genes que participan en transporte, es semejante (Fig. 23). A partir de las 4 horas de inducción con TSH se observan cambios significativos para los dos grupos de genes analizados (Fig. 23).

En conjunto, los datos obtenidos por ensayos de Western blot y qRT-PCR apuntan a que una mayor producción de cargo en respuesta al estímulo con TSH estaría acompañada de un aumento en los niveles proteicos de factores de transporte, sugiriendo que el incremento resultante en la capacidad secretora no es consecuencia del incremento de cargo ya que las cinéticas de expresión son similares. Se destaca que el incremento significativo de los niveles de ARNm de Rab1b ocurre luego de 4 horas de estímulo con TSH, mientras que el aumento de los niveles de las proteínas cargo analizadas, que serían las responsables de la sobrecarga del sistema de transporte, ocurre a partir de las 8-14 horas de estímulo. Por lo tanto, TSH estaría activando cascadas de señalamiento que impactarían simultáneamente sobre proteínas cargo y de transporte.

### *3.2 Forskolina mimetiza el efecto de TSH provocando cambios en los niveles de factores de transporte*

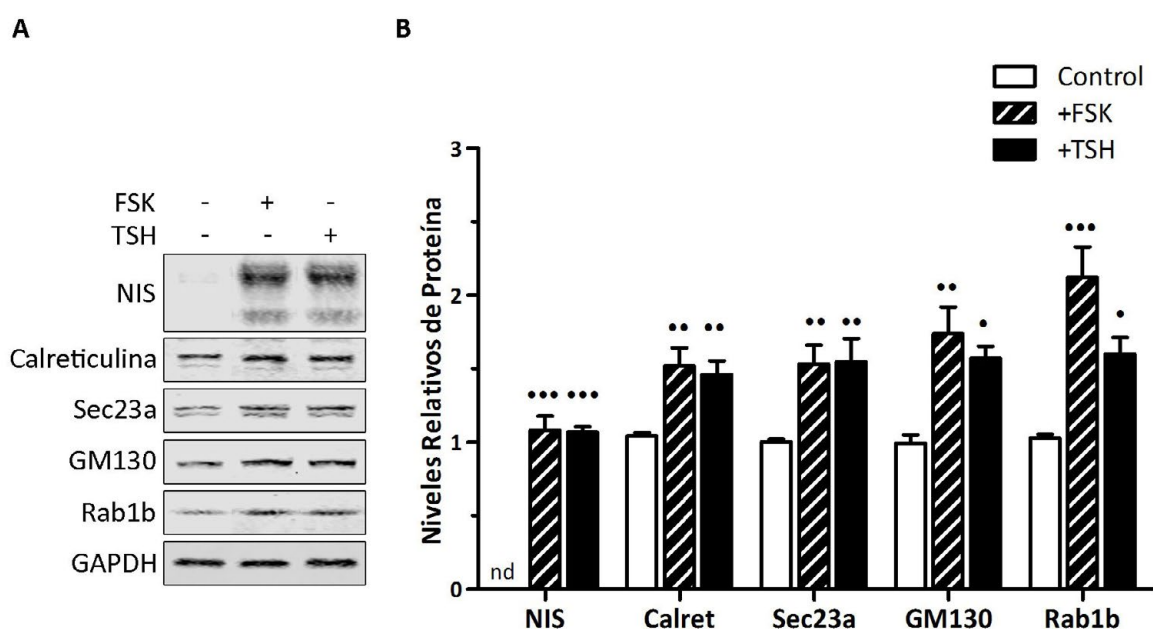
El receptor de TSH, TSHR, es integrante de la familia de receptores acoplados a proteínas G. Cuando TSH se une a su receptor dispara principalmente la activación de dos vías de señalamiento. Una, dependiente de proteína G subunidad  $\alpha_s$  ( $G_{\alpha_s}$ ) que lleva a un incremento de AMPc a través de la enzima adenilato ciclasa. En respuesta a esto la proteína quinasa A (PKA) se activa y posteriormente induce una cascada de fosforilación de proteínas, entre las cuales se encuentra CREB (“cAMP responsive element binding protein”). La otra vía, dependiente de proteína G subunidad  $\alpha_q$  ( $G_{\alpha_q}$ ), que induce la activación de vías dependiente de la proteína quinasa C (PKC) y fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), con fosforilación de Akt (Morshed et al., 2009). TSH regula la expresión de genes que codifican para proteínas importantes en la función tiroidea principalmente mediante la vía de la adenilato ciclasa/AMPc (Adenosil monofosfato cíclico; Vassart y Dumont, 1992; Venkateswaran et al., 2004).

Para explorar si los efectos observados sobre los componentes de transporte producidos por TSH son mediados por la vía de la adenilato ciclasa/AMPc, se analizó el efecto del agonista sintético de AMPc, Forskolina (FSK; Seamon et al., 1981). Para ello, se realizaron ensayos de Western blot empleando extractos proteicos obtenidos de células FRTL-5 no estimuladas (-FSK) o estimuladas con  $1\mu\text{g/mL}$  de FSK (+FSK) durante 24 horas y se determinaron los niveles de los factores de transporte Calreticulina, Sec23a, GM130 y Rab1b. Se consideró la

## Res. III

inducción de la expresión de NIS como control positivo de funcionamiento del sistema. En paralelo, se analizaron también los niveles de dichas proteínas en respuesta a TSH (+TSH). Se observó que luego de 24 horas de tratamiento con FSK los niveles de los factores de transporte analizados son mayores respecto a la condición basal (Fig. 24A y B). Además, los cambios provocados por FSK son semejantes a los observados por el estímulo con TSH (Fig. 24A y B).

Nuestros resultados sugieren que las vías de señalamiento intracelular activadas por TSH coordinan paralelamente la regulación de la expresión de proteínas específicas de tiroides y los factores de transporte. Asimismo, estos resultados muestran que al igual que TSH, FSK promueve cambios en los niveles proteicos de factores de transporte en células FRTL-



**Figura 24. Respuesta de los factores de transporte a FSK.** A. Ensayos de Western blot representativos realizados con extractos totales de células FRTL-5 incubadas en condición basal (control), estimuladas con FSK (+FSK) o TSH (+TSH) durante 24 horas. Se utilizaron anticuerpos contra los marcadores de RE: Calreticulina; de COPII: Sec23a; y de Golgi: GM130, Rab1b. NIS se utilizó como control positivo de inducción y GAPDH como control de carga. La detección se realizó y analizó en el equipo lector OdysseyClx. Las imágenes se convirtieron a escala de grises. B. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las bandas correspondientes a las proteínas indicadas, normalizada con la intensidad de GAPDH y relativa a la condición control, donde la relación se consideró igual a 1. Debido a que NIS no es detectable en la condición control, los resultados se relativizaron a la condición +TSH. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de los resultados obtenidos de 3 experimentos independientes realizados por duplicado, los cuales se analizaron mediante el test ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, considerándose estadísticamente significativo un  $p$ -valor  $< 0,05$  ( $\bullet = p < 0,05$ ;  $\bullet\bullet = p < 0,001$ ;  $\bullet\bullet\bullet = p < 0,0001$ ). nd: no detectable. La cuantificación se realizó empleando el software Image Studio.



## Res. III

5, indicando que los efectos observados son mediados por la vía de la adenilato ciclasa/AMPC. Además, como se describió en la sección 2.2 del Capítulo II, TSH incrementa los niveles de transcritos de genes que codifican a factores de transporte, lo que apunta a que su expresión esté siendo regulada a nivel transcripcional. En conjunto, esto sugiere que la acción estimuladora de TSH y FSK activan vías que impactan sobre las regiones regulatorias tanto de los genes específicos de tiroides como de los factores de transporte en estudio, sobre elementos respondedores a AMPC (CREs) presentes en las mismas. Este hallazgo va de la mano con la segunda hipótesis mencionada anteriormente, donde se planteó que la expresión de factores de transporte esté regulada por un factor de transcripción que se active vía TSH.

### *3.3 Las regiones regulatorias de los genes que codifican a factores de transporte contienen elementos respondedores a AMPC*

Para analizar la presencia de secuencias consenso de unión a factores de transcripción dentro de las regiones regulatorias de los genes que codifican a factores de transporte, se realizó un análisis bioinformático de regiones 5' corriente arriba del sitio de

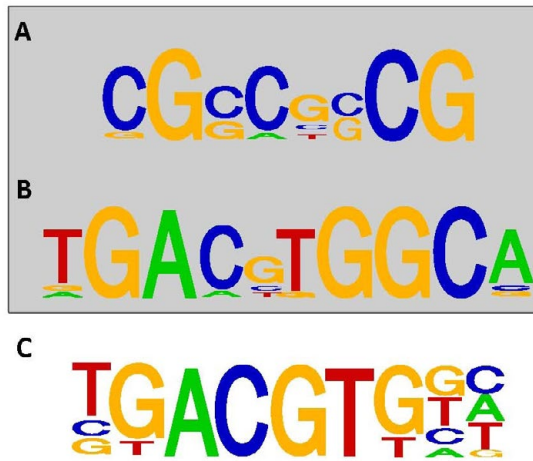
inicio de transcripción de dichos genes. Este estudio se hizo en colaboración con Diego Viale (Universidad de San Martín, Buenos Aires-Argentina), quien empleó el programa WebMOTIFS para analizar conjuntamente las regiones regulatorias de los genes (empleando la base de datos del genoma humano) detallados en la tabla 2. Se destaca que el análisis se efectuó examinando comparativamente todas las secuencias en busca de sitios enriquecidos presentes en todas ellas. Los genes analizados codifican para proteínas que participan en transporte de membranas y se seleccionaron de acuerdo a resultados previos obtenidos en el laboratorio donde se observó que Rab1b modulada la expresión de estos genes (Romero et al., 2013). Como se describe en la tabla, en color se resaltan los genes analizados en el presente trabajo de tesis.

Los resultados obtenidos indican la presencia de dos motivos altamente enriquecidos en todas las regiones analizadas (Fig. 25A y B). Uno de los motivos (Fig. 25A) se encuentra enriquecido 4.68 veces respecto a secuencias al azar, sin embargo, hasta el momento no se han descrito factores de transcripción que se le unan. Quedará pendiente determinar la importancia de esta región y las moléculas que interaccionan con ella. En cuanto al otro motivo (Fig. 25B) se encontró que está más enriquecido que el mencionado anteriormente (7.87 veces respecto a secuencias al azar) y que presenta alta homología con las secuencias de ADN correspondientes a varios elementos caracterizados como el elemento respondedor a AMPC (CRE) y el elemento respondedor a la falta de plegamiento de proteínas (UPRE; Chan et al., 2011). Los factores de transcripción de la subfamilia de proteínas CREB3 son capaces de unirse a estas secuencias.

	Nombre del gen	Abreviatura
1	Rab1b	RAB1B
2	KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	KDELR3
3	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	GOLGA2 (GM130)
4	Rab acceptor 1 (prenylated)	RABAC1
5	ADP-ribosylation factor-like 1	ARL1
6	Yip1 interacting factor homolog (S. cerevisiae)	YIF1A
7	ADP-ribosylation factor 4	ARF4
8	Signal recognition particle 54kDa	SRP54
9	SEC22 vesicle trafficking protein-like 1	SEC22L1
10	RAB26, member RAS oncogene family	RAB26
11	SEC24 related gene family, member D	SEC24D
12	RAB11 family interacting protein 2 (class I)	RAB11FIP2
13	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3	GOLGA3
14	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha	NAPA
15	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1	GOLGA1
16	Syntaxin binding protein 1	STXBP1
17	Golgi reassembly stacking protein 2, 55kDa	GORASP2
18	Bet1 golgi vesicular membrane trafficking protein	BET1
19	SEC31 homolog A	SEC31A
20	Vesicle docking protein p115 - USO1 vesicle transport factor	USO – VDP (P115)
21	Coatamer protein complex, subunit zeta 2	COPZ2
22	Coatamer protein complex, subunit gamma	COPG1
23	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	SERP1
24	Rho-related BTB domain containing 3	RHOBTB3
25	Ras-related GTP binding C	RRAGC
26	Syntaxin 3A	STX3A
27	RAB32, member RAS oncogene family	RAB32
28	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	GEM
29	cytohesin 1 Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1 PSCD1	CYTH1
30	Calreticulina	CALR
31	Rab5a	RAB5A
32	Rab7a	RAB7A

**Tabla 2. Genes que participan en transporte de membranas.** En rojo se destacan genes analizados por qRT-PCR en respuesta a TSH; en celeste, aquellos analizados por IF y/o WB; y en verde los analizados por qRT-PCR e IF y/o WB.

## Res. III



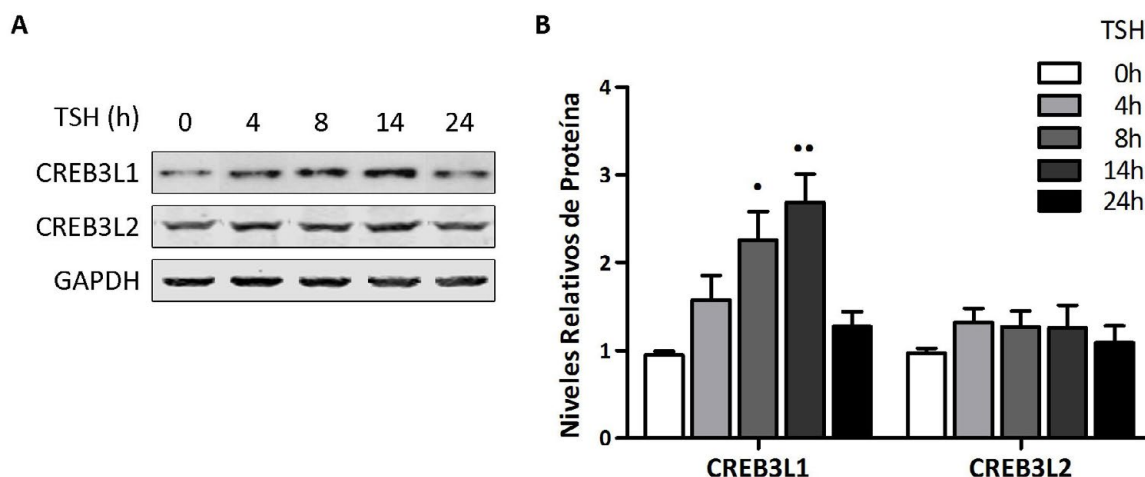
**Figura 25. Secuencias enriquecidas presentes en las regiones regulatorias de genes que participan en transporte de membranas.** Análisis de las regiones 5' de los genes mencionados en la tabla 2 mediante el programa WebMOTIFS, donde se hallaron dos motivos comunes presentes en todos los genes. A. Motivo no descrito hasta el momento. B. Motivo que posee alta homología con las secuencias del elemento respondedor a AMPc (CRE) y del elemento de respuesta a la falta de plegamiento de proteínas (UPRE). C. Sitio consenso de CrebA (Abrams y Andrew, 2005), ortólogo de *Drosophila* de los factores CREB3.

La familia de factores de transcripción CREB3 participa en la regulación de la expresión de proteínas tejido específicas (de secreción o membranas) en respuesta a un determinado estímulo (señales relacionadas al metabolismo, diferenciación e inflamación) y también controla la expresión de proteínas de transporte, incrementando así la capacidad secretora de las células reconociendo un sitio consenso similar a la secuencia CRE y UPRE (Fig. 25C; Fox et al., 2010; Barbosa et al., 2013).

### 3.4 El factor de transcripción CREB3L1 se activa en respuesta a TSH

Como primera aproximación al análisis de la posible participación de los factores CREB3 en la regulación de la expresión de proteínas de transporte inducida por TSH, se determinó la activación (clivaje) de proteínas de la subfamilia CREB3 en respuesta a TSH mediante ensayos de Western blot con extractos totales provenientes de células FRTL-5 incubadas en condición basal (0h) o estimuladas durante diferentes tiempos (4, 8, 14 y 24h), empleando anticuerpos que reconocen específicamente la fracción activa de cada proteína. Particularmente, el estudio se enfocó en analizar la activación de CREB3L1 y CREB3L2, ya que son los ortólogos de mamífero más cercanos a CREBA, factor de transcripción que regula la expresión de genes que integran la vía secretora en *Drosophila* (Fox et al., 2010). Se ha descrito que CREB3L1 y CREB3L2 se expresan en un gran número de órganos secretores (Omori et al., 2002; Kondo et al., 2005, 2007; Saito et al., 2007, 2009; Murakami et al., 2009) y que además estas proteínas son capaces de incrementar la capacidad secretora en células no especializadas (Fox et al., 2010).

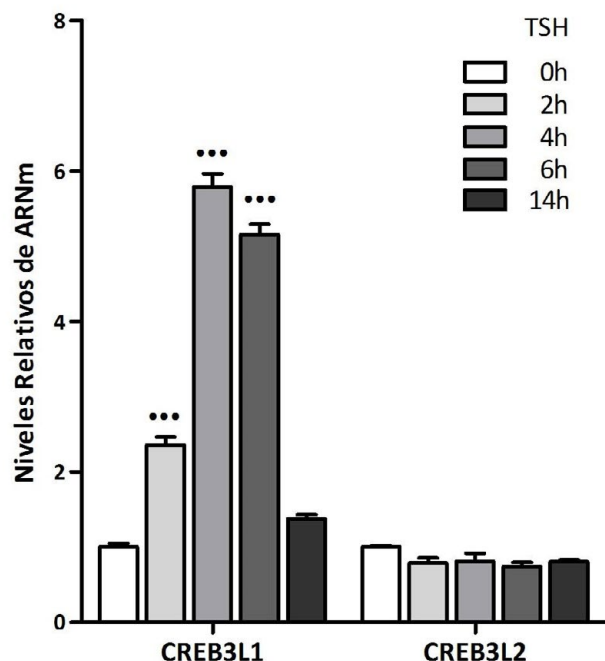
Como se mencionó en la introducción, la activación de las proteínas CREB3 involucra un mecanismo proteolítico regulado donde se libera su dominio N-terminal (fracción activa) que actúa como factor de transcripción (Murakami et al., 2009; Denard et al., 2012), activando



**Figura 26. Activación de CREB3L1 y CREB3L2 en respuesta a TSH.** A. Ensayos de Western blots representativos realizados con extractos totales de células FRTL-5 no estimuladas (0h) o estimuladas con TSH por 4, 8, 14 y 24 horas. Se utilizaron anticuerpos que reconocen la fracción activa de CREB3L1 y CREB3L2. GAPDH se empleó como control de carga. Para la detección se utilizó el reactivo de quimioluminiscencia ECL con exposición en placa radiográfica. B. Cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a las proteínas indicadas/GAPDH y relativa a la condición control (0h), donde la relación se consideró igual a 1. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de los resultados de al menos 3 experimentos independientes realizados por duplicado, los cuales se analizaron mediante el test ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, y se consideró estadísticamente significativo un  $p$ -valor  $< 0,05$  ( $\bullet = p < 0,05$ ;  $\bullet\bullet = p < 0,001$ ). La cuantificación se realizó empleando el software GelPro31

transcripcional diversos genes, incluso de ellos mismos (Murakami et al., 2006; Bailey et al., 2007). Los ensayos de Western blot indican que los niveles de CREB3L1 activo aumentan en función al estímulo con TSH, observándose un incremento gradual en las primeras horas de tratamiento, adquiriendo valores máximos después de 14 horas de inducción y disminuyendo a valores basales luego de 24 horas (Fig. 26A y B, paneles CREB3L1). En tanto, los niveles de CREB3L2 activo no cambiaron significativamente en respuesta a TSH, mostrando valores constantes durante todo el tratamiento (Fig. 26A y B, paneles CREB3L2).

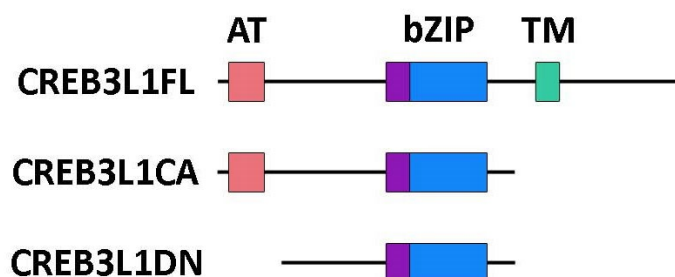
Además, se analizaron los niveles de ARNm de CREB3L1 y CREB3L2 mediante ensayos de qRT-PCR con ARN total proveniente de células FRTL-5 no estimuladas (0h) o estimuladas con TSH durante diferentes tiempos (2, 4, 6 y 14h). El estudio reveló que, en acuerdo con lo observado a nivel de proteínas, los niveles de transcripto de CREB3L1 incrementan en respuesta a TSH de manera dependiente del tiempo, presentando un incremento gradual en las primeras horas de tratamiento, adquiriendo valores máximos después de 4 horas de inducción y disminuyendo a valores basales a las 14 horas (Fig. 27, panel CREB3L1). Por su parte, los niveles de CREB3L2 se mantuvieron constantes frente a la inducción con TSH (Fig. 27, panel CREB3L2). Por lo que TSH no sólo induce la activación de CREB3L1, sino también incrementa sus niveles de transcripto.



**Figura 27. Niveles relativos de ARNm de CREB3L1 y CREB3L2 en respuesta a TSH.** Niveles relativos de ARNm determinados mediante transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real (qRT-PCR), a partir de ARN total de células FRTL-5 no estimuladas (0h) o estimuladas con TSH por 2, 4, 6 y 14 horas, empleando cebadores específicos y el equipo ABI 7500 de Applied Biosystems. Los datos se normalizaron considerando  $\beta$ -Actina como gen endógeno y se expresaron de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , usando como calibrador para cada gen el nivel de ARNm obtenido en la condición basal (0h). Las barras representan la media  $\pm$  EEM de los resultados obtenidos de 2 experimentos independientes realizados por triplicado, los cuales se analizaron mediante el test ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, considerándose estadísticamente significativo un  $p$ -valor  $< 0,05$  ( $\bullet\bullet\bullet = p < 0,0001$ ).

### 3.5 CREB3L1 promueve el incremento del volumen del complejo de Golgi

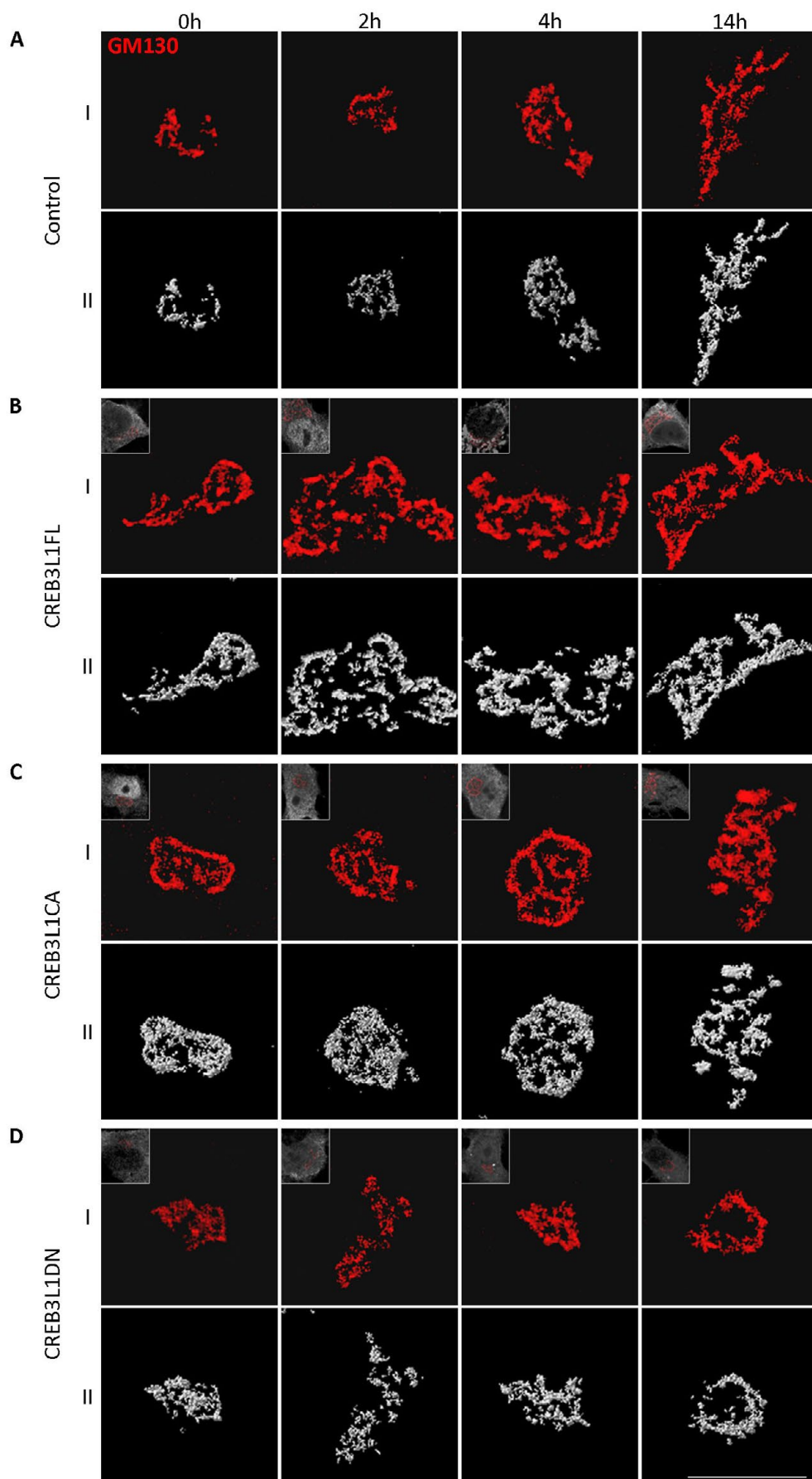
En células tiroideas, posiblemente CREB3L1 actúe también como factor de transcripción responsable del incremento de la expresión de genes que participan en el sistema de transporte de membranas. Si nuestra postura es correcta la sobreexpresión de CREB3L1 debería (de manera indirecta) promover cambios en el volumen del complejo de Golgi. Para analizar esto, células FRTL-5 se transfectaron transientemente con distintas construcciones de CREB3L1, se estimularon con TSH durante diferentes tiempos (0, 2, 4 y 14h) y se realizaron inmunofluorescencias empleando el marcador de Golgi GM130. Las construcciones de CREB3L1 utilizadas (clonadas en el vector pcDNA3) fueron tres: 1. la versión completa de la proteína salvaje (Full length, FL); 2. la forma procesada, constitutivamente activa (CA); y 3. la dominante negativa (DN; Fig. 28). La forma procesada carece del dominio transmembrana, lo cual corresponde a la proteína clivada, es decir, a la forma activa de la misma. La dominante negativa, además de carecer del dominio transmembrana, carece del dominio de activación transcripcional, por lo que no puede regular la producción de sus genes blanco. Estas



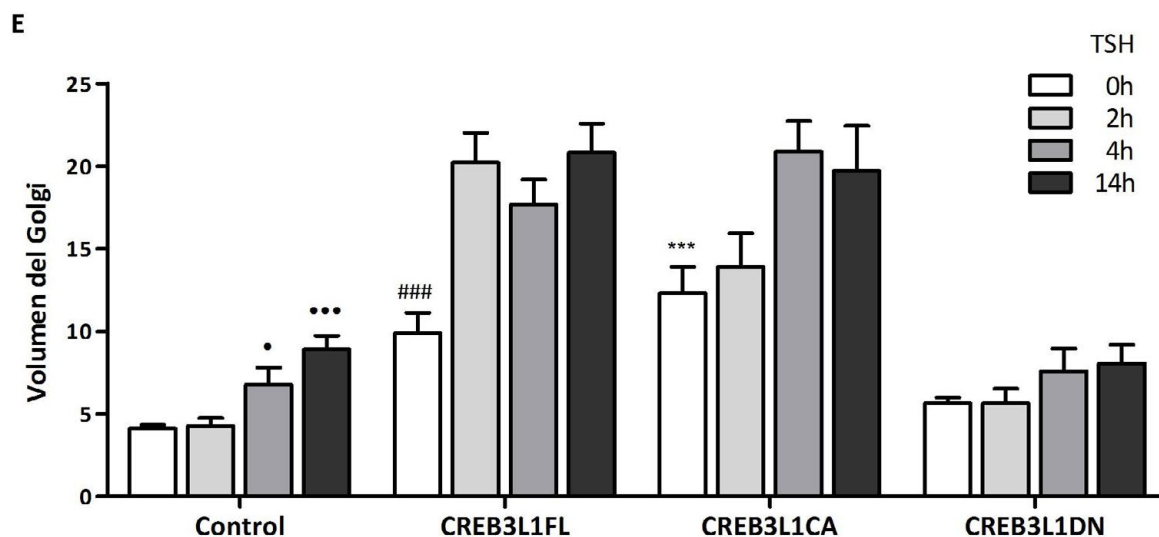
**Figura 28. Representación esquemática de las construcciones de CREB3L1 empleadas.** La secuencia que codifica para la versión completa (FL), la forma procesada, constitutivamente activa (CA), o la dominante negativa (DN) de la proteína se encuentran en el vector pcDNA3. AT: dominio de activación transcripcional. bZIP: dominio básico de cremallera de leucinas. TM: dominio transmembrana.

construcciones fueron gentilmente donadas por los Doctores Deborah J. Andrew (The Johns Hopkins University, Estados Unidos) y David Murphy (University of Bristol, United Kingdom - University of Malaya, Malasia; Fox et al., 2010; Greenwood et al., 2014). Las imágenes obtenidas por microscopía confocal se deconvolucionaron espacialmente (Fig 29A, B, C y D, paneles I) con el software Huygens Essential y se obtuvieron las reconstrucciones tridimensionales de las mismas, a partir de las cuales se determinó el volumen del Golgi (Fig 29A, B, C y D, paneles II y 29E). Se detectó que, tal como se describió en la sección 2.3 del capítulo II (Fig. 19), en células FRTL-5 no transfectadas (Control) la estructura del complejo de Golgi cambia luego de la inducción con TSH, observándose incremento en su volumen a partir de las 4 horas de tratamiento, siendo significativo luego de 14 horas, donde aumenta  $\approx 3$  veces su tamaño respecto a la condición basal (0h; Fig. 29A y E panel Control). En cuanto a las células que sobreexpresan CREB3L1FL y CREB3L1CA, se observó que en la condición basal (0h) el volumen del Golgi es mayor al de las células no transfectadas (Control). Además, se vio que a partir de las 2 horas de estímulo con TSH el volumen del Golgi aumenta marcadamente, alcanzado valores máximos en los tiempos evaluados (Fig. 29B y E panel CREB3L1FL, y C y E panel CREB3L1CA, respectivamente). El hecho de que el volumen del Golgi no incremente aún más después de las 4 horas de inducción puede deberse a que el sistema esté saturado. Finalmente, en células que expresan la mutante dominante negativa CREB3L1DN, se observó una tendencia semejante a la condición control pero el volumen del complejo de Golgi no cambia significativamente en respuesta a TSH, afirmando que la mutante tiene efecto de dominante negativa (Fig. 29D y E panel CREB3L1DN).

# Res. III







**Figura 29. Efecto de CREB3L1 sobre el volumen del complejo de Golgi. I.** Imágenes deconvolucionadas de inmunofluorescencias de células FRTL-5 (A) no transfectadas (Control), (B) transfectadas con la versión completa de CREB3L1 (CREB3L1FL), (C) transfectadas con la forma activa (CREB3L1CA), o (D) transfectadas con la dominante negativa (CREB3L1DN), no estimuladas (0h) o estimuladas con TSH durante los tiempos indicados. Para la inmunodetección del Golgi se utilizó el marcador GM130. En los recuadros se muestra que las células analizadas expresan la construcción indicada. II. Reconstrucciones 3-D de las imágenes mostradas en I. La barra representa 10  $\mu\text{m}$ . E. Cuantificación del volumen del complejo de Golgi en las distintas condiciones ensayadas. Las barras representan la media  $\pm$  EEM de los resultados obtenidos de un experimento representativos donde se examinaron 5-10 células. Los datos se analizaron mediante el test ANOVA seguido del post-test de comparación múltiple de Bonferroni, considerándose estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*= $p < 0.05$ ; \*\*\*/###/\*\*\*= $p < 0.0001$ ). En todos los casos se comparó con el tiempo 0 de la condición control. La deconvolución especial, la reconstrucción 3-D y la cuantificación se realizaron con el Software Huygens Essential.

### 3.6 Conclusiones Capítulo III

La estimulación de células FRTL-5 con TSH, induce la síntesis de proteínas importantes en la función tiroidea (carga) y está acompañada de un aumento en los niveles proteicos de factores de transporte. Estos dos procesos ocurren paralelamente, sugiriendo que el incremento resultante en la maquinaria de transporte es independiente del incremento de carga.

El empleo del agonista sintético de AMPc, FSK, induce un efecto similar al de TSH, promoviendo cambios en los niveles proteicos de factores de transporte, lo que indica que los efectos observados requieren de la vía de la adenilato ciclasa/AMPc.



## Res. III

En todas las regiones regulatorias analizadas de un gran número de genes que codifican a factores de transporte se determinó la presencia de un motivo altamente enriquecido, el cual presenta alta homología con la secuencia descrita para el elemento respondedor a AMPc (CRE).

TSH no sólo activa la proteólisis de CREB3L1, sino también incrementa sus niveles de transcripción. Además, CREB3L1 promueve el incremento del volumen del complejo de Golgi, incluso en células incubadas en condición basal. Contrariamente, la expresión de la dominante negativa de CREB3L1 impide el aumento del volumen del Golgi, inclusive luego de la estimulación con TSH.

# Discusión

En células eucariotas, la vía secretora cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. Permite que diversas macro-moléculas lleven a cabo adecuadamente su función al alcanzar su correcto destino mediante una serie de etapas conectadas a través de intermediarios de transporte (vesículas y/o túbulos). La primera etapa de la vía consiste en el transporte de membranas entre el RE y el complejo de Golgi, cuya eficiencia depende de la participación de una gran variedad de familias de proteínas (Lee et al., 2004; Short et al., 2005).

## **Rol de Rab1b en la dinámica y función de COPII**

Las proteínas destinadas a ser secretadas (proteínas cargo) son transportadas al RE y recubiertas por el complejo de cubierta COPII. En los sitios de salida del retículo endoplásmico, COPII tiene la capacidad de deformar la bicapa lipídica, donde modula la selección y la concentración de proteínas cargo, generando los intermediarios de transporte que se desprenden de las membranas del RE (Lee y Miller, 2007; Sato y Nakano, 2007). Luego de la salida del RE, las vesículas COPII se fusionan de manera homotípica (Xu y Hay, 2004) promoviendo la generación de estructuras de membranas recubiertas con el complejo de cubierta COPI. Estos transportadores se dirigen con dirección al complejo de Golgi a través de microtúbulos del citoesqueleto y se fusionan con la cisterna cis del aparato de Golgi (Bannykh et al., 1996). En todo este proceso, la GTPasa Rab1b coordina múltiples etapas como la formación, desplazamiento, “tethering” y fusión de los intermediarios de transporte, interaccionando con diferentes proteínas efectoras (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). Es por ello que en los últimos años las proteínas Rab GTPasas han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas debido al rol primordial que poseen en numerosos aspectos del transporte intracelular de membranas (Tisdale et al., 1992; Hutagalung y Novick, 2011). Hasta el momento se sabía que Rab1b recluta a GBF1 (Monetta et al., 2007), GEF de Arf1 (Claude et al., 1999; Kawamoto et al., 2002), quien modula la asociación de COPI a membranas en la interfase RE-Golgi (Garcia-Mata et al., 2003). En este trabajo de tesis se analizó la importancia de la GTPasa Rab1b en la regulación de la función del complejo de cubierta COPII.

Nuestros resultados indican que Rab1b colocaliza con el complejo COPII en estructuras punteadas periféricas de la interfase ERES/Golgi (Fig. 13A). Además se encontró que, en su forma activa, Rab1b interacciona con los componentes de COPII Sec23, Sec24 y Sec31 (Fig. 13B). Se corroboró que dicha interacción ocurre *in vivo*, pero no se determinó si es directa. Rab1b también interacciona con el complejo COPI, ya que recluta a GBF1 (Monetta et al., 2007), quien origina la asociación de dicho complejo en la interfase de los ERES (Garcia-Mata et al., 2003). En conjunto, estos datos sugieren que posiblemente Rab1b participe

promoviendo la maduración secuencial de los intermediarios de transporte a partir de los sitios de salida del RE.

Por otra parte, la inhibición de la actividad de Rab1b, mediante la expresión de la mutante dominante negativa (Rab1N121I), induce fragmentación del complejo de Golgi, disociación de COPI de membranas y pérdida de la organización perinuclear de COPII en las proximidades del complejo de Golgi, que sólo exhibe su típico patrón punteado disperso por todo el citosol (Fig. 14A). Además, se observó que la inhibición de Rab1b altera el tamaño de las estructuras punteadas de COPII, evidenciándose mayor cantidad de estructuras de menor tamaño (Fig. 14B). Cabe recalcar que la inhibición de Rab1b provoca la disociación de COPI de membranas, mientras que COPII sólo pierde su marca perinuclear, manteniéndose asociada a las membranas de los ERES, por lo que Rab1b no participaría en la asociación del complejo COPII en el RE. A partir de resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, se comprobó que el aumento del ensamblado de COPII inducido por la sobre-expresión de proteínas de Golgi (Guo y Linstedt, 2006) no se encuentra alterado por la inhibición de Rab1b (datos no mostrados). Esto sugiere que el aumento en el número de pequeñas estructuras COPII causado por la depleción de Rab1b y la permanencia de COPII en las membranas de los ERES, no se debe a una deficiencia de asociación/ensamblado de COPII a membranas.

Además, Rab1b modula la dinámica de asociación/disociación de COPII a membranas, ya que la presencia de la mutante activa de esta GTPasa reduce la velocidad de asociación/disociación de este complejo a las membranas (Fig. 15A). La disrupción del Golgi y la disociación de  $\beta$ -COP de membranas en células depletadas de Rab1b fueron previamente reportadas (Hutt y Balch, 2008; Monetta et al., 2007), siendo el fenotipo resultante consecuencia de la perturbación de la interacción de Rab1b con GBF1 (requerida para la asociación de GBF1 a membranas). Dado que Rab1b recluta a GBF1 a la interfase de los ERES, promoviendo la asociación de COPI, no descartamos la posibilidad de que los cambios en COPII producidos por la depleción de Rab1b sean una consecuencia indirecta de su interacción con GBF1 y la falta de reclutamiento de COPI. Sin embargo, esto parecería poco probable ya que la depleción de GBF1 induce la tubulación de GM130 en lugar de la fragmentación del Golgi, como en el caso de células depletadas de Rab1b (Szul et al., 2007). Por otro lado, en células depletadas de GBF1, las estructuras punteadas de COPII también pierden su concentración perinuclear (Szul et al., 2007). No obstante, estas estructuras no presentan menores tamaños, como lo hacen ante la inhibición de Rab1b, sugiriendo que la dinámica de COPII no está alterada en células depletadas de GBF1. En concordancia, en células tratadas con BFA no se detectó un cambio significativo en la dinámica de estructuras COPII en comparación a células no tratadas (Ward et al., 2001).

Para entender la estabilización de COPII en membranas de células que expresan Rab1Q67L y el incremento en el número de pequeñas estructuras COPII en células depletadas de Rab1b, se consideró el hecho que la dinámica de la cubierta COPII está regulada por el intercambio de GDP-GTP en Sar1. Este proceso es catalizado por la GEF Sec12 y por la GAP Sec23 (subunidad del complejo Sec23/24 que forma COPII), y parecería que la interacción de Rab1b-GTP (activa) con Sec23 reduciría su actividad GAP. Esto disminuiría la hidrólisis de Sar1-GTP, lo que induciría la estabilización de COPII en membranas (afectando la dinámica de COPII en la etapa de desensamblado), tal como se mostró mediante los ensayos de FRAP. Por otro lado, en células depletadas de Rab1b, la actividad GAP de Sec23 podría no estar regulada, provocando un incremento en la hidrólisis de Sar1-GTP con una consecuente disminución de la estabilización de COPII en membranas (reduciendo el tamaño de las estructuras).

Los resultados presentados en esta sección, junto con los datos publicados, apoyan el modelo donde Rab1b asegura no sólo la especificidad de la unión de las vesículas con sus organelas blanco, sino también, modula la estabilidad de COPII en membranas, permitiendo que COPII permanezca formado el tiempo que sea necesario para acoplar el cargo capturado y alcanzar la total formación y función de COPII. En conclusión, Rab1b no sólo es esencial en etapas de fusión de intermediarios de transporte (Allan et al., 2000; Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001), sino que también es requerida en etapas previas, donde participa en la maduración de dichos intermediarios, modulando la dinámica de asociación/disociación de COPII a membranas y el reclutamiento de COPI (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007), permitiendo la progresión del transporte.

## **Cambios moleculares y estructurales en células tiroideas en repuesta a TSH**

Como otras funciones celulares, el transporte intracelular de membranas requiere de la coordinación de una serie de organelas y de componentes para su correcto funcionamiento. La secreción de proteínas tiene lugar en todos los tipos celulares, y está muy incrementada en células secretoras especializadas. Hasta el momento, poco se conoce acerca del proceso que permite la regulación selectiva de la capacidad secretora en células. Los órganos glandulares secretores deben adaptarse a la necesidad creciente de secreción de proteínas que ocurre durante el desarrollo, diferenciación, o cambios en las condiciones fisiológicas. Sin embargo, una pregunta muy importante, que hasta el momento no ha sido del todo esclarecida, es cómo están coordinados los cambios en la capacidad secretora que permitan una correcta expresión, plegado, modificación y transporte de los productos secretados para lograr dicha adaptación.

En tiroides, TSH estimula la síntesis y secreción de proteínas necesarias para la producción de hormonas tiroideas (Brown et al., 2000). Debido a que estas proteínas deben ser transportadas a sus correctas localizaciones, se necesitan condiciones de transporte

óptimas para mantener la secreción, y así, el correcto funcionamiento de la glándula tiroidea. En este trabajo describimos como la maquinaria de transporte de membranas responde al estímulo secretor de TSH, acompañando el incremento de proteínas de tiroides, previniendo la acumulación de las mismas y permitiendo el correcto funcionamiento celular.

Nuestros resultados muestran que, el estímulo con TSH promueve conjuntamente la síntesis de proteínas de tiroides, como NIS, TG y TPO, y el incremento de los niveles de proteínas que participan en transporte de membranas (Fig. 16; 17 y 22). Se observó el incremento de chaperonas del RE: Calreticulina y Calnexina; proteínas del complejo de cubierta COPII: Sec23a, Sec31a y Sec16b; COPI: GBF1; del complejo de Golgi: GM130, Rab1b, p115, Golgin97, KDELR3 y GalNACT2. En conjunto, estas proteínas integran la primera etapa de transporte de la vía secretora, que comprende la salida de proteínas cargo del RE y su transporte al complejo de Golgi. También, se detectó el incremento de los niveles de componentes de la vía endocítica: Rab5a y Rab7a. Si bien la vía endocítica no participa en la secreción de proteínas de tiroides, es esencial para la endocitosis (desde el coloide) y posterior procesamiento intracelular de la tiroglobulina en la producción de hormonas tiroideas (Marinò y McCluskey, 2000). Los niveles de ARNm de los genes que codifican para las proteínas estudiadas, también aumentaron en respuesta a TSH (Fig. 18 y 23), lo que sugiere que el estímulo secretor promueve mayor transcripción de genes que participan en el transporte de membranas con el consecuente incremento de sus niveles proteicos. Estos cambios moleculares terminan impactando estructuralmente en las organelas que integran la vía secretora, como por ejemplo, en el complejo de Golgi. Nuestros hallazgos revelan que, en respuesta a TSH, el aparato de Golgi amplía considerablemente su volumen (Fig. 19), mediante el incremento del número de cisternas por stack y la superficie de las mismas (Fig. 20). No se puede descartar el hecho de que los cambios observados en el complejo de Golgi se deban al aumento en el flujo de cargo. Sin embargo, esto parece poco probable ya que en células de mamífero se describió que el volumen del complejo de Golgi se extiende en respuesta al incremento de enzimas de Golgi y no debido al aumento de flujo de cargo (Guo y Linstedt, 2006). En nuestro sistema, entre otras proteínas del Golgi, observamos el incremento de la enzima de Golgi GalNACT2 en respuesta a TSH (Fig. 19), lo que justificaría el incremento del volumen de esta organela.

El mantenimiento de la estructura y función del Golgi depende del flujo constante de proteínas desde el RE (Ward et al., 2001) y ambos pueden ser vistos como un único sistema sostenido por un ciclado dinámico y constante de proteínas, lípidos y membranas. Cuando este sistema se expande durante la inducción por TSH de los tirocitos, el balance de lo exportado y lo importado desde y hacia el RE debe adaptarse para permitir que dicha expansión ocurra. En este trabajo de tesis se demostró que TSH incrementa los niveles de proteínas que

integran el complejo de cubierta COPII, localizado en los ERES. A diferencia de lo que sucede a nivel de Golgi, el aumento de flujo de carga sí ocasiona incremento del número y tamaño de los ERES, en líneas celulares adherentes de mamíferos (Guo y Linstedt, 2006). Esto sugiere que el aumento de proteínas cargo de tiroides, ocasionado por el tratamiento con TSH, es lo que provoca el incremento de los ERES. Alternativamente, los tirocitos podrían estar experimentando una expansión a nivel de RE, semejante a lo que sucede con el complejo de Golgi, lo cual podría llevar a un incremento proporcional de los ERES. Esta hipótesis se apoya con lo que sucede en la interfase del ciclo celular. En esta etapa, los ERES incrementan de manera proporcional al aumento del tamaño celular y al crecimiento del RE (Hammond y Glick, 2000), lo cual ocurre en ausencia de incremento de carga.

Nuestros resultados sugieren que, frente a un estímulo secretor, la capacidad de la maquinaria de transporte de membrana aumenta permitiéndole a la célula adaptarse a la necesidad creciente de secreción de proteínas.

Christis y colaboradores describieron en tirocitos el incremento en la capacidad de ensamblado de proteínas en el ER (Christis et al., 2009). Ellos, empleando el modelo celular FRTL-5, revelan que el incremento de los niveles de TG (proteína cargo) en respuesta a TSH no genera acumulación de esta proteína en el RE. En su lugar, observan que chaperonas del RE y enzimas de plegado alcanzan su tasa máxima de síntesis inmediatamente después de la estimulación con TSH, antes que haya un aumento significativo de los niveles de TG. El incremento resultante en la capacidad de plegado, previo a la producción de la proteína cargo, previene el estrés celular causado por acumulación de proteínas no plegadas. La ausencia de la inducción de estrés se confirmó por la falta de activación de componentes clásicos de la vía que responde a proteínas no plegadas (UPR). En este sentido, se demostró la ausencia de inducción de CHOP, que es un mensajero secundario de UPR implicado en promover apoptosis (Marciniak et al., 2004), lo que implica que hay ausencia de estrés persistente de RE (Rutkowski et al., 2006). Si bien estos autores pudieron determinar que frente a la inducción con TSH hay cambios en los niveles de proteínas del sistema de transporte (chaperonas y enzimas de plegado) y que no se genera estrés de RE por el incremento de proteínas cargo, no indagan sobre el mecanismo molecular que lleva al incremento de proteínas residentes del RE y el consecuente aumento en la capacidad de plegado. Tampoco analizaron otros componentes que participan en transporte membranas.

Por nuestra parte, también determinamos la preparación de las células al incremento inminente de proteínas de secreción mediante el estudio de la cinética de expresión de proteínas del sistema de transporte en comparación a la de proteínas cargo. Luego de la estimulación con TSH, la actividad metabólica de los tirocitos cambia: mientras la síntesis de proteínas de expresión constitutiva como GAPDH se mantiene constante, la síntesis

de proteínas que participan en transporte de membranas aumenta significativamente, mostrando cinéticas de incremento de expresión similares a las de proteínas cargo (Fig. 22 y 23). Por lo tanto, en respuesta a un estímulo secretor como es TSH, los tirocitos no sólo preparan la maquinaria de plegado de proteínas de RE para el correcto procesamiento del cargo que se está produciendo (Christis et al., 2009), sino que también activan la maquinaria que va a transportar a dicho cargo a través de la vía secretora.

La adaptación de la vía secretora en respuesta a un estímulo ha sido estudiada en otros tipos celulares. En este sentido, la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas secretoras de anticuerpos es otro ejemplo de células donde ocurren cambios en la vía secretora para responder al incremento del cargo. En ausencia de estímulo, las células B presentan una mínima cantidad de endomembranas. Luego de su activación, se observa incremento de las membranas del RE; el complejo de Golgi aumenta considerablemente su tamaño, los ERES proliferan rápidamente, en paralelo con un marcado incremento en la secreción de anticuerpos (Kirk et al., 2009). En estas células el incremento de la capacidad secretora responde a un “programa de desarrollo” que conlleva a su diferenciación a células plasmáticas, que culmina con apoptosis. En el caso de los tirocitos, la estrategia para sobrellevar el aumento de cargo inducido por TSH es similar: atraviesan por un proceso de expansión de los componentes de la vía secretora, con la salvedad de que dicho proceso no afecta su viabilidad (ya que no se activaría un proceso de muerte celular programada luego de la inducción con TSH).

Además, Brewer y colaboradores (Brewer et al., 1997) mostraron que una batería de células no secretoras, luego de la depleción de factores de crecimiento esenciales, responden a la adición de dichos factores regulando positivamente los niveles de ARNm de BiP y GRP94 antes de un incremento general en la síntesis de glicoproteínas. La expansión del RE como medida preventiva para evitar señales de estrés parece ser una estrategia general de las células.

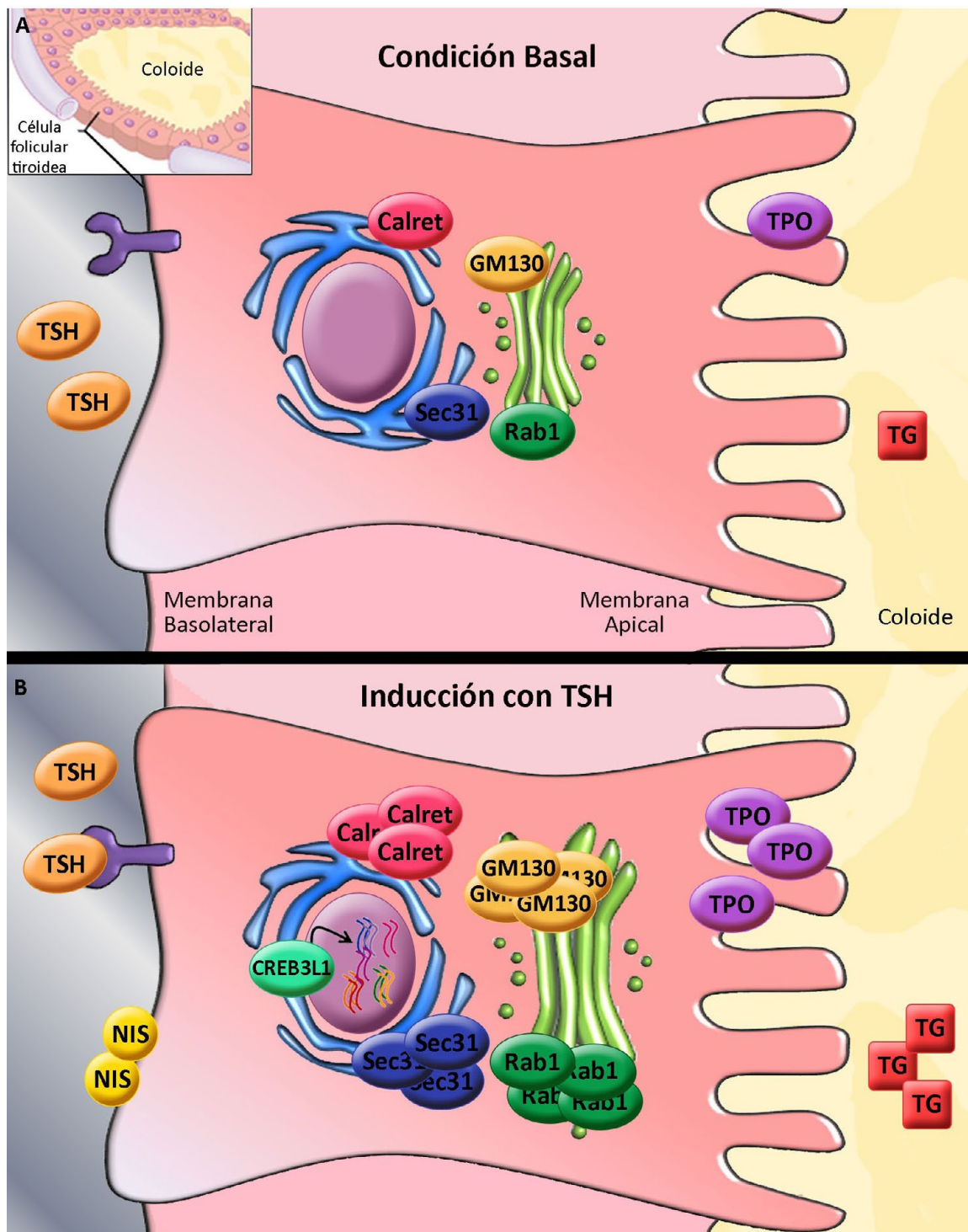
Si el estrés por proteínas no plegadas no es la señal que genera los cambios observados en el incremento en el volumen del Golgi, la maquinaria de transporte de membrana y el aumento en la capacidad de plegado (este último punto fue descrito por Christis et al., 2009), ¿entonces cuál es? En tirocitos, TSH activa un receptor acoplado a proteína G (Szkudlinski et al., 2002), el cual activa su proteína G asociada, lo que lleva a la producción de múltiples moléculas de señalamiento que pueden activar una gran variedad de vías de transducción de señales y factores de transcripción (Kimura et al., 2001). Debido a que los efectos observados sobre la maquinaria de transporte por el estímulo con TSH, ocurren también en respuesta al agonista sintético de AMPc, Forskolina (FSK), planteamos que los cambios que ocurren en los tirocitos siguen una cascada de señalamiento que involucra



elementos respondedores a AMPc. Potenciales candidatos son los factores de transcripción de la familia de proteínas de unión al elemento respondedor a AMPc (CREB; Hai y Hartman, 2001). Esta familia de proteínas presenta una región básica de cremallera de leucinas (bZip) que se une a una secuencia de ADN presente en la región regulatoria de sus genes blanco, denominada elemento ATF/CRE (Hai y Hartman, 2001). Las vías de señalamiento que se inician por la unión de TSH a su receptor activa tanto, genes cargo, como un gran número de factores de transporte de membranas. Se describió que la activación de genes cargo, como NIS y TG, requiere, entre otros factores (algunos específicos de tiroides), de la unión de CREB a sus elementos CRE atípicos (Chun y Di Lauro, 2001), mientras que se desconocen los factores involucrados en la activación de las proteínas que participan en transporte en tiroides. Lo que sucede en células tiroideas se podría comparar con lo que ocurre en la placenta. El proceso de diferenciación que tiene lugar en la placenta humana comprende la diferenciación de células mononucleares (trofoblastos mononucleares) a multinucleadas (sincicios multinucleados) y la adquisición de un fenotipo endócrino activo, secretor de hormonas proteicas, siendo dicho proceso regulado por una gran cantidad de señales. Estas señales promueven la expresión de genes fusogénicos, como sincitina-1 y -2, e incrementan la producción de hormonas como la gonadotropina coriónica humana (hCG) y la lactógeno placentaria humana (hPL; Knerr et al., 2005; Peters et al., 2000). Estudios realizados en diversos modelos de diferenciación placental (que incluyen líneas celulares de coriocarcinoma, cultivos primarios y explantos placentarios) demostraron el rol primordial que tienen las cascadas de cAMP/PKA y MAPK (ERK1/2 y p38) en este proceso (Shi et al., 1993; Yang et al., 2003; Johnstone et al., 2005; Green et al., 2006). Las cascadas de señalamiento mencionadas son similares a las activadas en tirocitos (Fig. 11; Vassart y Dumont, 1992). En sistemas placentarios, las vías de las MAPKs son activadas por la enzima adenilato ciclasa y, si bien tienen acciones sinérgicas en la secreción de hCG y la regulación de genes fusogénicos, parecerían actuar por mecanismos distintos. Se observó que mecanismos dependientes de MAPK-p38, pero independientes de CREB (activado por MAPK-ERK1/2), controlan la expresión de genes fusogénicos a través de los factores CREB3L1 (OASIS) y GCMa; mientras que la producción de genes específicos como hCG sería regulada por la activación de CREB mediada por MAPK-ERK1/2 (Delidakis et al., 2010). Debido a lo anteriormente explicado es probable que, en tirocitos la activación de CREB sea necesaria para la síntesis de proteínas que intervienen en la producción de hormonas tiroideas, como NIS, TG y TPO, mientras que otros factores respondedores a AMPc, como CREB3L1, estén involucrados en la regulación de los niveles de proteínas que participan en el transporte de membranas. Nosotros postulamos que, en células FRTL-5 CREB3L1 es el responsable de regular los cambios observados en la expresión de factores de transporte y el incremento del volumen del Golgi.

En concordancia con el planteo de que CREB3L1 sería un regulador maestro, se observó que la expresión de proteínas lisosomales es regulada por un factor maestro común. Se describió que genes lisosomales presentan un comportamiento transcripcional coordinado y responden a un factor de la familia bZip, TFEB, el cual controla la biogénesis y la función lisosomal, revelando la adaptación de estas organelas a las demandas ambientales. Estos hallazgos se alcanzaron gracias a la identificación de una secuencia nucleotídica o “motivo” común presente en las regiones regulatorias de una gran batería de genes que codifica para proteínas lisosomales, a la cual se une el factor transcripcional anteriormente mencionado (Sardiello et al., 2009; Settembre et al., 2013). En este trabajo se analizaron comparativamente las regiones de ADN regulatorias presentes en genes que codifican para proteínas que participan en transporte de membranas. Identificamos la presencia de dos secuencias o “motivos” compartidos en una amplia variedad de genes que participan en el transporte vesicular (Fig. 25). Para una de estas secuencias, no se han descrito hasta el momento factores de transcripción que se le unan. En cuanto al otro motivo, presenta alta homología con varias secuencias consenso descritas, entre las que se encuentran el elemento respondedor a AMPc (CRE) y el elemento de respuesta a la falta de plegamiento de proteínas (UPRE; Chan et al., 2011). Notablemente, los factores de transcripción CREB3 reconocen la secuencia de CRE (TGACGTCA), de UPRE (TGACGTGG), del elemento box-B (TACACGTAATC) y del elemento respondedor a estrés de RE II (ERSE-II; ATTGG-N-CCACG; Lu et al., 1997; DenBoer et al., 2005; Ben Aicha et al., 2007; Jang et al., 2007; Audas et al., 2008).

Nuestros resultados muestran por primera vez que, en tirocitos la proteína CREB3L1, pero no CREB3L2, se activa e incrementa su expresión en respuesta a TSH. Además, CREB3L1 es necesario para que ocurra el aumento del volumen del complejo de Golgi, dado que la sobre-expresión de esta proteína es capaz de inducir tal cambio, incluso en ausencia de TSH, probablemente regulando la expresión de proteínas de Golgi (Fig. 29). Esto va de la mano con lo observado en *Drosophila*, donde se vio que CREBA, ortólogo de CREB3L1, es necesario y suficiente para producir en tejidos secretores altos niveles de genes que integran la vía secretora, a través de la unión del factor de transcripción a su sitio consenso identificado en la región regulatoria de dichos genes (Fox et al., 2010). Esto concuerda con el hecho de que la sobre-expresión de CREB3L1 en células HeLa es capaz de inducir la expresión de múltiples componentes de la vía secretora, siendo dichas células una línea no secretora (Fox et al., 2010). Asimismo, la sobre-expresión de CREB3L3 en células 293, otra línea celular no secretora, promueve la expresión de genes que regulan la capacidad secretora y el metabolismo de lípidos (Barbosa et al., 2013).



**Figura 30. Representación esquemática de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.** En condición basal, las células tiroideas presentan niveles basales de factores de transporte, y también de TG y TPO y niveles indetectables de NIS, proteínas necesarias para la síntesis de hormonas tiroideas. Cuando las células son estimuladas con TSH, incrementa la producción de las proteínas específicas de tiroides e induce la síntesis de NIS. Simultáneamente, aumenta la expresión de factores de transporte. Estos cambios moleculares impactan estructuralmente en el complejo de Golgi, aumentando su tamaño, de manera dependiente del factor de transcripción CREB3L1. Estos resultados sugieren que frente a un estímulo secretor, la capacidad de la maquinaria de transporte de membrana aumenta permitiéndole a la célula adaptarse a la necesidad creciente de secreción de proteínas.

Además, encontramos enriquecido el sitio consenso de reconocimiento de CREB3L1 en las regiones regulatorias de todos los genes en cuestión. Por lo tanto, postulamos que en células FRTL-5 este factor es capaz de incrementar la capacidad secretora celular mediante la regulación de la expresión de la maquinaria de transporte que participa en la vía secretora. Próximos ensayos estarán orientados a confirmar que CREB3L1 activa transcripcionalmente la expresión de los genes analizados.

En resumen nuestros resultados indican que, para mantener la homeostasis celular y poder responder al incremento de carga luego de la estimulación con TSH, se induce una respuesta celular global, sugiriendo que vías de señalamiento comunes coordinan paralela y complementariamente la regulación de la expresión de proteínas específicas de tiroides y los factores de transporte (Fig. 30).

## **Impacto y perspectivas**

El transporte de membranas involucra grandes flujos de membranas y proteínas a través de las distintas organelas celulares, y puede estar sujeto a perturbaciones fisiológicas y patológicas que lo aparten del equilibrio (Hirschberg et al., 1998; Mironov et al., 2001; Pulvirenti et al., 2008; Trucco et al., 2004). Comprender cómo están coordinadas las diferentes etapas de transporte y cómo las células se adaptan a un determinado estímulo en condiciones fisiológicas permite entender las posibles desregulaciones que pueden iniciar patologías y así establecer posibles tratamientos.

Desde el punto vista general, se ha identificado que algunas enfermedades genéticas y proliferativas parecerían originarse por fallas en el transporte de membranas. Tal es el caso de la displasia craneolenticulosutural, de la displasia espondiloepifisiaria tarda (causadas por mutaciones en la subunidad Sec23a de COPII o en TRAPPC2 del complejo TRAPP, respectivamente) y de diversos tipos de cáncer (Scott et al., 2009; De Matteis y Luini, 2011). Es por ello que es muy importante conocer detalladamente la regulación de las diferentes etapas de transporte y las moléculas que participan para ser capaces de reconocer fallas que originen patologías y poder desarrollar posibles terapias. Como ejemplo de proteínas de transporte capaces de revertir procesos patológicos son KDELR y Rab1, quienes promueven la degradación de proteínas que inducen neurodegeneración, como la superóxido dismutasa 1,  $\alpha$ -sinucleína, posiblemente mediante procesos de autofagia (Cooper et al., 2006; Gitler et al., 2008; Wang et al., 2011). Es necesario continuar con la investigación básica del transporte de membranas para mejorar la comprensión de la patogénesis de distintas enfermedades originadas por fallas en el transporte.

Desde el punto de vista de las células tiroideas, se ha descrito que el cáncer de tiroides es la neoplasia endocrina más frecuente (Cooper et al., 2009). NIS es una glicoproteína de membrana plasmática que participa en la captación de yoduro en células tiroideas, evento esencial para la biosíntesis de hormonas tiroideas. Por su capacidad de transportar yodo, NIS es una excelente molécula blanco para la incorporación de yodo radiactivo ( $^{131}\text{I}$ ), terapia selectiva para el tratamiento de cáncer de tiroides (Kogai et al., 2006). Ciertos tumores poseen un menor estado de diferenciación y baja captación de yodo, acompañados por baja o nula expresión de NIS (Riesco-Eizaguirre et al., 2006). El estudio de los mecanismos moleculares que regulan la expresión y localización de NIS posee un importante impacto clínico dado que los carcinomas de tiroides que no concentran yodo poseen pronóstico desfavorable. Este trabajo de tesis provee resultados acerca de los mecanismos por los cuales la estimulación de la secreción induce cambios en la expresión de factores de transporte de la vía secretora. Los resultados obtenidos contribuyen a formar los cimientos moleculares para vincular los conocimientos de una línea de investigación básica, enfocada al estudio de mecanismos de transporte intracelular, con eventos moleculares relacionados al establecimiento de un fenotipo tumoral de células de tiroides resistente a tratamientos convencionales con  $^{131}\text{I}$  debido a los bajos niveles de expresión de NIS.

Por otro lado, se ha descrito que CREB3L1 se expresa en células no metastásicas de cáncer de mama, y esta expresión se pierde en células metastásicas (Mellor et al., 2013). La presencia de CREB3L1 en células normales, reprime la expresión de genes involucrados en crecimiento, supervivencia celular, angiogénesis, migración e invasión; mientras que cuando se pierde su expresión, se expresan genes que favorecen la supervivencia y la angiogénesis, promoviendo la persistencia de células cancerígenas, y la progresión hacia un fenotipo metastásico (Mellor et al., 2013). Asimismo, se ha demostrado que la expresión de CREB3L1 es requerida para la activación de p21 mediada por el agente quimioterapéutico “doxorubicina”, previniendo la proliferación de células cancerígenas. En células que carecen de CREB3L1, la efectividad de doxorubicina disminuye (Denard et al., 2012). Todos estos resultados postulan a CREB3L1 como un supresor tumoral, por lo que comprender su regulación y mecanismo de acción ayudaría a establecer posibles tratamientos antitumorales. Resultados presentados en esta tesis indican por primera vez que, en células tiroideas TSH induce el incremento de la expresión de CREB3L1. En base a estos hallazgos y los antecedentes en relación a CREB3L1 y cáncer proponemos profundizar el análisis comparativo de los niveles de CREB3L1 y su activación en células tiroideas normales y en células tumorales.

Por todo lo anteriormente descrito, consideramos que esta tesis posee relevancia fisiológica y patológica directa en humanos.

# Bibliografía

- Abrams, E.W., and Andrew, D.J. (2005).** CrebA regulates secretory activity in the *Drosophila* salivary gland and epidermis. *Development*. 132, 2743-2758.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (ed.) (2013).** *Essential Cell Biology*, Fourth Edition. Garland Publishing, New York & London
- Altan-Bonnet, N., Sougrat, R., and Lippincott-Schwartz, J. (2004).** Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology*. 16, 364-372.
- Alvarez, C., Garcia-Mata, R., Brandon, E., and Sztul, E. (2003).** COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*. 14, 2116-2127.
- Allan, B.B., Moyer, B.D., and Balch, W.E. (2000).** Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science*. 289, 444-448.
- Ambesi-Impiombato, F.S., Parks, L.A., and Coon, H.G. (1980).** Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 77, 3455-3459.
- Ang, S.F., and Fölsch, H. (2012).** The role of secretory and endocytic pathways in the maintenance of cell polarity. *Essays in Biochemistry*. 53, 29-39.
- Audas, T.E., Li, Y., Liang, G., and Lu, R. (2008). A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*. 28, 3952-3966.
- Bailey, D., and O'Hare, P. (2007).** Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response. *Antioxidants & Redox Signaling*. 9, 2305-2321.
- Balch, W.E. (1990).** Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends in Biochemical Sciences*. 15, 473-477.
- Bannykh, S.I., Rowe, T., and Balch, W.E. (1996).** The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *The Journal of cell biology*. 135, 19-35.
- Barbosa, S., Fasanella, G., Carreira, S., Llarena, M., Fox, R., Barreca, C., Andrew, D., and O'Hare, P. (2013).** An orchestrated program regulating secretory pathway genes and cargos by the transmembrane transcription factor CREB-H. *Traffic*. 14, 382-398.
- Barlowe, C., d'Enfert, C., and Schekman, R. (1993).** Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 268, 873-879.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., and Schekman, R. (1994).** COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 77, 895-907.
- Barlowe, C.K., and Miller, E.A. (2013).** Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*. 193, 383-410.
- Barrowman, J., Bhandari, D., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2010).** TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 11, 759-763.
- Bayer, M., Fischer, J., Kremerskothen, J., Ossendorf, E., Matanis, T., Konczal, M., Weide, T., and Barnekow, A. (2005).** Identification and characterization of Iporin as a novel interaction partner for rab1. *BMC Cell Biology*. 6, 15-29.
- Beard, M., Satoh, A., Shorter, J., and Warren, G. (2005).** A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 280, 25840-25848.
- Beck, R., Rawet, M., Wieland, F.T., and Cassel, D. (2009).** The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS letters*. 583, 2701-2709.

- Ben Aicha, S., Lessard, J., Pelletier, M., Fournier, A., Calvo, E., and Labrie, C. (2007).** Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells. *Physiological Genomics*. 31, 295-305.
- Bethune, J., Wieland, F., and Moelleken, J. (2006).** COPI-mediated transport. *The Journal of Membrane Biology*. 211, 65-79.
- Bhattacharyya, D., and Glick, B.S. (2007).** Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Molecular Biology of the Cell*. 18, 839-849.
- Bhuin, T., and Roy, J.K. (2014).** Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research*. 328, 1-19.
- Biocarta. (2015).** Rab GTPases Mark Targets In The Endocytotic Machinery., ed. Biocarta.
- Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975).** Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *The Journal Of Cell Biology*. 67, 852-862.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S. (2004).** The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116, 153-166.
- Bonifacino, J.S., and Lippincott-Schwartz, J. (2003).** Coat proteins: shaping membrane transport. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 4, 409-414.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007).** GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 129, 865-877.
- Brandizzi, F., and Barlowe, C. (2013).** Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 14, 382-392.
- Brewer, J.W., Cleveland, J.L., and Hendershot, L.M. (1997).** A pathway distinct from the mammalian unfolded protein response regulates expression of endoplasmic reticulum chaperones in non-stressed cells. *EMBO Journal*. 16, 7207-7216.
- Brown, H.A., Gutowski, S., Moomaw, C.R., Slaughter, C., and Sternweis, P.C. (1993).** ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell*. 75, 1137-1144.
- Brown, R.S., Shalhoub, V., Coulter, S., Alex, S., Joris, I., De Vito, W., Lian, J., and Stein, G.S. (2000).** Developmental regulation of thyrotropin receptor gene expression in the fetal and neonatal rat thyroid: relation to thyroid morphology and to thyroid-specific gene expression. *Endocrinology*. 141, 340-345.
- Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J.C., and Ferro-Novick, S. (2007).** TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature*. 445, 941-944.
- Cai, Y., Chin, H.F., Lazarova, D., Menon, S., Fu, C., Cai, H., Sclafani, A., Rodgers, D.W., De La Cruz, E.M., Ferro-Novick, S., and Reinisch, K.M. (2008).** The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes. *Cell*. 133, 1202-1213.
- Cancino, J., Capalbo, A., Di Campli, A., Giannotta, M., Rizzo, R., Jung, J.E., Di Martino, R., Persico, M., Heinklein, P., Sallese, M., and Luini, A. (2014).** Control systems of membrane transport at the interface between the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Developmental Cell*. 30, 280-294.
- Claude, A., Zhao, B.P., Kuziemyky, C.E., Dahan, S., Berger, S.J., Yan, J.P., Arnold, A.D., Sullivan, E.M., and Melancon, P. (1999).** GBF1: A novel Golgi-associated BFA-resistant gua-



- nine nucleotide exchange factor that displays specificity for ADP-ribosylation factor 5. *The Journal of Cell Biology*. 146, 71-84.
- Collins, R.N. (2003).** "Getting it on"-GDI displacement and small GTPase membrane recruitment. *Molecular Cell*. 12, 1064-1066.
- Connerly, P.L., Esaki, M., Montegna, E.A., Strongin, D.E., Levi, S., Soderholm, J., and Glick, B.S. (2005).** Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Current Biology*. 15, 1439-1447.
- Cooper, A.A., Gitler, A.D., Cashikar, A., Haynes, C.M., Hill, K.J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K.E., Liu, F., Cao, S., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Marsischky, G., Kolodner, R.D., Labaer, J., Rochet, J.C., Bonini, N.M., and Lindquist, S. (2006).** Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science*. 313, 324-328.
- Cooper, D.S., Doherty, G.M., Haugen, B.R., Kloos, R.T., Lee, S.L., Mandel, S.J., Mazzaferri, E.L., McIver, B., Pacini, F., Schlumberger, M., Sherman, S.I., Steward, D.L., Tuttle, R.M., American Thyroid Association (ATA) Guidelines Taskforce on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. (2009). Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 19, 1167-1214.
- Cottam, N.P., and Ungar, D. (2012).** Retrograde vesicle transport in the Golgi. *Protoplasma*. 249, 943-955.
- Chan, C.P., Kok, K.H., and Jin, D.Y. (2011).** CREB3 subfamily transcription factors are not created equal: Recent insights from global analyses and animal models. *Cell & Bioscience*. 1, 6-12.
- Christis, C., Fullaondo, A., Schildknecht, D., Mkrtchian, S., Heck, A.J., and Braakman, I. (2010).** Regulated increase in folding capacity prevents unfolded protein stress in the ER. *Journal of Cell Science*. 123, 787-794.
- Chun, J.T., and Di Lauro, R. (2001).** Characterization of the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 109, 23-26.
- D'Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2006).** ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 7, 347-358.
- Dancourt, J., and Barlowe, C. (2010).** Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annual Reviews of Biochemistry*. 79, 777-802.
- De Leeuw, H.P., Koster, P.M., Calafat, J., Janssen, H., van Zonneveld, A.J., van Mourik, J.A., and Voorberg, J. (1998).** Small GTP-binding proteins in human endothelial cells. *British Journal of Haematology* 103, 15-19.
- De Matteis, M.A., and Luini, A. (2011).** Mendelian disorders of membrane trafficking. *The New England Journal of Medicine*. 365, 927-938.
- Delidakis, M., Gu, M., Hein, A., Vatish, M., and Grammatopoulos, D.K. (2011).** Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 331, 213-220.
- Denard, B., Lee, C., and Ye, J. (2012).** Doxorubicin blocks proliferation of cancer cells through proteolytic activation of CREB3L1. *eLife*. 1.
- Denard, B., Seemann, J., Chen, Q., Gay, A., Huang, H., Chen, Y., and Ye, J. (2011).** The membrane-bound transcription factor CREB3L1 is activated in response to virus infection to inhibit proliferation of virus-infected cells. *Cell Host & Microbe*. 10, 65-74.
- DenBoer, L.M., Hardy-Smith, P.W., Hogan, M.R., Cockram, G.P., Audas, T.E., and Lu, R.**

- (2005). Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 331, 113-119.
- Der, C.J., and Balch, W.E. (2000).** GTPase traffic control. *Nature*. 405, 751-752.
- Diao, A., Frost, L., Morohashi, Y., and Lowe, M. (2008).** Coordination of golgin tethering and SNARE assembly: GM130 binds syntaxin 5 in a p115-regulated manner. *The Journal of Biological Chemistry*. 283, 6957-6967.
- Donaldson, J.G., Cassel, D., Kahn, R.A., and Klausner, R.D. (1992).** ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89, 6408-6412.
- Dufey, E., Sepúlveda, D., Rojas-Rivera, D., and Hetz, C. (2014).** Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 307, 582-594.
- Dumont, J.E., Lamy, F., Roger, P., and Maenhaut, C. (1992).** Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiological Reviews*. 72, 667-697.
- Elias, M. (2010).** Patterns and processes in the evolution of the eukaryotic endomembrane system. *Molecular Membrane Biology*. 27, 469-489.
- Farhan, H., and Rabouille, C. (2011).** Signalling to and from the secretory pathway. *Journal of Cell Science*. 124, 171-180.
- Fox, R.M., and Andrew, D.J. (2015).** Transcriptional regulation of secretory capacity by bZip transcription factors. *Frontiers in Biology*. 10, 28-51.
- Fox, R.M., Hanlon, C.D., and Andrew, D.J. (2010).** The CrebA/Creb3-like transcription factors are major and direct regulators of secretory capacity. *The Journal of Cell Biology*. 191, 479-492.
- Friedlander, M., and Blobel, G. (1985).** Bovine opsin has more than one signal sequence. *Nature*. 318, 388-343.
- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C., and Sommer, T. (2000).** A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nature Cell Biology*. 2, 379-384.
- Garcia-Mata, R., Szul, T., Alvarez, C., and Sztul, E. (2003).** ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Molecular Biology of the Cell*. 14, 2250-2261.
- Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., and Walter, P. (2013).** Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5, a013169.
- Giannotta, M., Ruggiero, C., Grossi, M., Cancino, J., Capitani, M., Pulvirenti, T., Consoli, G.M., Geraci, C., Fanelli, F., Luini, A., and Sallese, M. (2012).** The KDEL receptor couples to Gαq/11 to activate Src kinases and regulate transport through the Golgi. *EMBO Journal*. 31, 2869-2881.
- Gitler, A.D., Bevis, B.J., Shorter, J., Strathearn, K.E., Hamamichi, S., Su, L.J., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Rochet, J.C., McCaffery, J.M., Barlowe, C., and Lindquist, S. (2008).** The Parkinson's disease protein alpha-synuclein disrupts cellular Rab homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105, 145-150.
- Goitre, L., Trapani, E., Trabalzini, L., and Retta, S.F. (2014).** The Ras superfamily of small GTPases: the unlocked secrets. *Methods in Molecular Biology*. 1120, 1-18.

- Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A., and Saraste, J. (1990).** Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature*. 345, 553-556.
- Green, K.E., Thota, C., Hankins, G.D., Yallampalli, C., and Dong, Y.L. (2006).** Calcitonin generated peptide stimulates human villous trophoblast cell differentiation in vitro. *Molecular Human Reproduction*. 12, 443-450.
- Greenwood, M., Bordieri, L., Greenwood, M.P., Rosso Melo M., Colombari, D.S., Colombari, E., Paton, J.F., and Murphy, D. (2014).** Transcription factor CREB3L1 regulates vasopressin gene expression in the rat hypothalamus. *The Journal of Neuroscience*. 34, 3810-3820.
- Grieco, D., Beg, Z.H., Romano, A., Bifulco, M., and Aloj, S.M. (1990).** Cell cycle progression and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase are regulated by thyrotropin in FRTL-5 rat thyroid cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 265, 19343-19350.
- Guo, Y., and Linstedt, A.D. (2014).** Binding of the vesicle docking protein p115 to the GTPase Rab1b regulates membrane recruitment of the COPI vesicle coat. *Cellular Logistics*. 3, e27687.
- Guo, Y., and Linstedt, A.D. (2006).** COPII-Golgi protein interactions regulate COPII coat assembly and Golgi size. *The Journal of Cell Biology*. 174, 53-63.
- Guo, Y., Punj, V., Sengupta, D., and Linstedt, A.D. (2008). Coat-tether interaction in Golgi organization. *Molecular Biology of the Cell*. 19, 2830-2843.
- Gurkan, C., Lapp, H., Alory, C., Su, A.I., Hogenesch, J.B., and Balch, W.E. (2005).** Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the membrane. *Molecular Biology of the Cell*. 16, 3847-3864.
- Haas, A.K., Yoshimura, S., Stephens, D.J., Preisinger, C., Fuchs, E., and Barr, F.A. (2007).** Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *Journal of Cell Science*. 120, 2997-3010.
- Hai, T., and Hartman, M.G. (2001).** The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*. 273, 1-11.
- Hammond, A.T., and Glick, B.S. (2000).** Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Molecular Biology of the Cell*. 11, 3013-3030.
- Hampton, R.Y. (2000).** ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Current Biology*. 10, R518-R521.
- Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F.T., and Rothman, J.E. (1994).** En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *The Journal of Cell Biology*. 124, 883-892.
- Helms, J.B., and Rothman, J.E. (1992).** Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*. 360, 352-354.
- Hino, K., Saito, A., Kido, M., Kanemoto, S., Asada, R., Takai, T., Cui, M., Cui, X., and Imaizumi, K. (2014).** Master regulator for chondrogenesis, Sox9, regulates transcriptional activation of the ER stress transducer BFF2H7/CREB3L2 in chondrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 289, 13810-13820.
- Hirschberg, K., Miller, C.M., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E.D., Phair, R.D., and Lippincott-Schwartz, J. (1998).** Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of Golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *The Journal Of Cell Biology*. 143.
- Hong, W. (2005).** SNAREs and traffic. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1744, 120-144.
- Hughes, H., Budnik, A., Schmidt, K., Palmer, K.J., Mantell, J., Noakes, C., Johnson, A., Carter, D.A., Verkade, P., Watson, P., and Stephens, D.J. (2009).** Organisation of human

ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *Journal of Cell Science*. 122, 2924-2934.

- Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011).** Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*. 91, 119-149.
- Hutt, D.M., and Balch, W.E. (2008).** Rab1b silencing using small interfering RNA for analysis of disease-specific function. *Methods in Enzymology*. 438, 1-10.
- Isozaki, O., Kohn, L.D., Kozak, C.A., and Kimura, S. (1989).** Thyroid peroxidase: rat cDNA sequence, chromosomal localization in mouse, and regulation of gene expression by comparison to thyroglobulin in rat FRTL-5 cells. *Molecular Endocrinology*. 3, 1681-1692.
- Ivan, V., de Voer, G., Xanthakis, D., Spoorendonk, K.M., Kondylis, V., and Rabouille, C. (2008).** *Drosophila* Sec16 mediates the biogenesis of tER sites upstream of Sar1 through an arginine-rich motif. *Molecular Biology of the Cell*. 19, 4352-4365.
- Jackson, L.P., Kummel, D., Reinisch, K.M., and Owen, D.J. (2012).** Structures and mechanisms of vesicle coat components and multisubunit tethering complexes. *Current Opinion in Cell Biology*. 24, 475-483.
- Jang, S.W., Kim, Y.S., Kim, Y.R., Sung, H.J., and Ko, J. (2007).** Regulation of human LZIP expression by NF- $\kappa$ B and its involvement in monocyte cell migration induced by Lkn-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 282, 11092-11100.
- Johnstone, E.D., Sibley, C.P., Lowen, B., and Guilbert, L.J. (2005).** Epidermal growth factor stimulation of trophoblast differentiation requires MAPK11/14 (p38 MAP kinase) activation. *Biology of Reproduction*. 73, 1282-1288.
- Jones, S., Newman, C., Liu, F., and Segev, N. (2000).** The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Molecular Biology of the Cell*. 11, 4403-4411.
- Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S., and Nakayama, K. (2002).** GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic*. 3, 483-495.
- Kienzle, C., and von Blume, J. (2014).** Secretory cargo sorting at the trans-Golgi network. *Trends in Cell Biology*. 24, 584-593.
- Kimura, T., Van Keymeulen, A., Golstein, J., Fusco, A., Dumont, J.E., and Roger, P.P. (2001).** Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocrine Reviews*. 22, 631-656.
- Kirk, S.J., Cliff, J.M., Thomas, J.A., and Ward, T.H. (2010).** Biogenesis of secretory organelles during B cell differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*. 87, 245-255.
- Knerr, I., Schubert, S.W., Wich, C., Amann, K., Aigner, T., Vogler, T., Jung, R., Dötsch, J., Rascher, W., and Hashemolhosseini, S. (2005).** Stimulation of GCMa and syncytin via cAMP-mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS Letters*. 579, 3991-3998.
- Kogai, T., Endo, T., Saito, T., Miyazaki, A., Kawaguchi, A., and Onaya, T. (1997).** Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 138, 2227-2232.
- Kogai, T., Taki, K., and Brent, G.A. (2006).** Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 13, 797-826.
- Kohno, K. (2007).** How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 9, 2295-2303.
- Kondo, S., Murakami, T., Tatsumi, K., Ogata, M., Kanemoto, S., Otori, K., Iseki, K., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2005).** OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signal-

- ling in astrocytes. *Nature Cell Biology*. 7, 186-194.
- Kondo, S., Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Ogata, M., Kanemoto, S., Nara, S., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Hara, H., and Imaizumi, K. (2007).** BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Molecular and Cellular Biology*. 27, 1716-1729.
- Kuehn, M.J., Herrmann, J.M., and Schekman, R. (1998).** COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature*. 391, 187-190.
- Lee, A.S. (1992).** Mammalian stress response: induction of the glucoseregulated protein family. *Current Opinion in Cell Biology*. 4, 267-273.
- Lee, M.C., and Miller, E.A. (2007).** Molecular mechanisms of COPII vesicle formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 18, 424-434.
- Lee, M.C., Miller, E.A., Goldberg, J., Orci, L., and Schekman, R. (2004).** Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20, 87-123.
- Levy, O., Dai, G., Riedel, C., Ginter, C.S., Paul, E.M., Lebowitz, A.N., and Carrasco, N. (1997).** Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94, 5568-5573.
- Linstedt, A.D., Jesch, S.A., Mehta, A., Lee, T.H., Garcia-Mata, R., Nelson, D.S., and Sztul, E. (2000).** Binding relationships of membrane tethering components. The giantin N terminus and the GM130 N terminus compete for binding to the p115 C terminus. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 10196-10201.
- Liu, C.Y., Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2000).** Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*. 275, 24881-24885.
- Lu, L., Tai, G., and Hong, W. (2004).** Autoantigen Golgin-97, an effector of Arl1 GTPase, participates in traffic from the endosome to the trans-golgi network. *Molecular Biology of the Cell*. 15, 4426-4443.
- Luini, A., Mavelli, G., Jung, J., and Cancino, J. (2014).** Control systems and coordination protocols of the secretory pathway. *F1000Prime Reports*. 6.
- Luo, R., and Randazzo, P.A. (2008).** Kinetic analysis of Arf GAP1 indicates a regulatory role for coatomer. *The Journal of Biological Chemistry*. 283, 21965-21977.
- Malhotra, V., Serafini, T., Orci, L., Shepherd, J.C., and Rothman, J.E. (1989).** Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*. 58, 329-336.
- Mandon, E.C., Trueman, S.F., and Gilmore, R. (2013).** Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 5, 5.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004).** CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & Development*. 18, 3066-3077.
- Marinò, M., McCluskey, R.T. (2000).** Role of thyroglobulin endocytic pathways in the control of thyroid hormone release. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 279, C1295-1306.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., and Yeung, T. (1998).** COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. 93, 263-275.
- Mellman, I., and Simons, K. (1992).** The Golgi complex: in vitro veritas? *Cell*. 68, 829-840.

# Bibl.

- Mellor, P., Deibert, L., Calvert, B., Bonham, K., Carlsen, S.A., and Anderson, D.H. (2013).** CREB3L1 is a metastasis suppressor that represses expression of genes regulating metastasis, invasion, and angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 33, 4985-4996.
- Miller, E., Antony, B., Hamamoto, S., and Schekman, R. (2002).** Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *The EMBO Journal*. 21, 6105-6113.
- Miller, E.A., and Barlowe, C. (2010).** Regulation of coat assembly-sorting things out at the ER. *Current Opinion in Cell Biology*. 22, 447-453.
- Mironov, A.A., Beznoussenko, G.V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H.S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R.S., Fusella, A., Lupetti, P., Berger, E.G., Geerts, W.J., Koster, A.J., Burger, K.N., and Luini, A. (2001).** Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *The Journal Of Cell Biology*. 155, 1225-1238.
- Mironov, A.A., Beznoussenko, G.V., Polishchuk, R.S., and Trucco, A. (2005).** Intra-Golgi transport: a way to a new paradigm? *Biochimica et biophysica acta*. 1744, 340-350.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F. and Novick, P. (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annual Review of Biochemistry*. 81, 637-659.
- Monetta, P., Slavin, I., Romero, N., and Alvarez, C. (2007).** Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Molecular Biology of the Cell*. 18, 2400-2410.
- Moore, K.A., and Hollien, J. (2012).** The unfolded protein response in secretory cell function. *Annual Review of Genetics*. 46, 165-183.
- Morshed, S.A., Latif, R., and Davies, T.F. (2009).** Characterization of thyrotropin receptor antibody-induced signaling cascades. *Endocrinology*. 150, 519-529.
- Mossessova, E., Bickford, L.C., and Goldberg, J. (2003).** SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*. 114, 483-495.
- Moyer, B.D., Allan, B.B., and Balch, W.E. (2001).** Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic*. 2, 268-276.
- Mukhopadhyay, A., Quiroz, J.A. and Wolkoff, A.W. (2014).** Rab1a regulates sorting of early endocytic vesicles. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 306, G412-424.
- Murakami, T., Kondo, S., Ogata, M., Kanemoto, S., Saito, A., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2006).** Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *Journal of Neurochemistry*. 96, 1090-1100.
- Murakami, T., Saito, A., Hino, S., Kondo, S., Kanemoto, S., Chihara, K., Sekiya, H., Tsumagari, K., Ochiai, K., Yoshinaga, K., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Kou, I., Furui-chi, T., Ikegawa, S., Ikawa, M., Okabe, M., Wanaka, A., and Imaizumi, K. (2009).** Signaling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nature Cell Biology*. 11, 1205-1211.
- Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T.E., and Warren, G. (1995).** Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *The Journal of Cell Biology*. 131, 1715-1726.
- Ng, D.T., and Walter, P. (1994).** Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology*. 6, 510-516.
- Nie, Z., Hirsch, D.S., and Randazzo, P.A. (2003).** Arf and its many interactors. *Current Opinion in Cell Biology*. 15, 396-404.
- Nuoffer, C., Davidson, H.W., Matteson, J., Meinkoth, J. and Balch, W.E. (1994).** A GDP-bound of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport

- between Golgi compartments. *The Journal of Cell Biology*. 125, 225-237.
- Nyathi, Y., Wilkinson, B.M., and Pool, M.R. (2013).** Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *1833*, 2392-2402.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000).** Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 279, 445-450.
- Omori, Y., Imai, J., Suzuki, Y., Watanabe, S., Tanigami, A., and Sugano, S. (2002).** OASIS is a transcriptional activator of CREB/ATF family with a transmembrane domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 293, 470-477.
- Orci, L., Perrelet, A., Ravazzola, M., Wieland, F.T., Schekman, R., and Rothman, J.E. (1993).** "BFA bodies": a subcompartment of the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90, 11089-11093.
- Ortiz Sandoval, C., and Simmen, T. (2012).** Rab proteins of the endoplasmic reticulum: functions and interactors. *Biochemical Society Transactions*. 40, 1426-1432.
- Pahl, H.L. (1999).** Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus. *Physiological Reviews*. 79, 683-701.
- Panagopoulos, I., Moller, E., Dahlen, A., Isaksson, M., Mandahl, N., Vlamis-Gardikas, A., and Mertens, F. (2007).** Characterization of the native CREB3L2 transcription factor and the FUS/CREB3L2 chimera. *Genes Chromosomes Cancer*. 46, 181-191.
- Park, C.S., and Lee, P.H. (1994).** Vesicular transport with emphasis on exocytosis. *Yonsei Medical Journal* 35, 355-377.
- Patterson, G.H., Hirschberg, K., Polishchuk, R.S., Gerlich, D., Phair, R.D. and Lippincott-Schwartz, J. (2008).** Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell*. 133, 1055-1067.
- Peters, T.J., Chapman, B.M., Wolfe, M.W., and Soares, M.J. (2000).** Placental lactogen-I gene activation in differentiating trophoblast cells: extrinsic and intrinsic regulation involving mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Journal of Endocrinology*. 165, 443-456.
- Pfeffer, S., and Aivazian, D. (2004).** Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 5, 886-896.
- Pfeffer, S.R. (2001).** Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends in Cell Biology*. 11, 487-491.
- Polonsky, K.M.S., and Kronenberg, H.M. (2011).** Williams: Libro de Endocrinología. E. Saunders, editor, Philadelphia - Estados Unidos.
- Pulvirenti, T., Giannotta, M., Capestrano, M., Capitani, M., Pisanu, A., Polishchuk, R.S., San Pietro, E., Beznoussenko, G.V., Mironov, A.A., Turacchio, G., Hsu, V.W., Sallese, M., and Luini, A. (2008).** A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway. *Nature CELL Biology*. 10, 912-922.
- Reyna, C., Purrington, T., and SoRelle, J. (2001-2015).** Mutagenetix.
- Riesco-Eizaguirre, G., Gutiérrez-Martínez, P., García-Cabezas, M.A., Nistal, M., and Santisteban, P. (2006).** The oncogene BRAF V600E is associated with a high risk of recurrence and less differentiated papillary thyroid carcinoma due to the impairment of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> targeting to the membrane. *Endocrine-Related Cancer*. 13, 257-269.
- Rodriguez-Boulan, E., and Musch, A. (2005).** Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochimica et biophysica acta*. 1744, 455-464.
- Romero, N., Dumur, C.I., Martinez, H., García, I.A., Monetta, P., Slavin, I., Sampieri, L., Koritschoner, N., Mironov, A.A., De Matteis, M.A., and Alvarez, C. (2013).** Rab1b overexpression modifies Golgi size and gene expression in HeLa cells and modulates the thy-

- rotrophin response in thyroid cells in culture. *Molecular Biology of the Cell*. 24, 617-632.
- Ron, D., and Walter, P. (2007)**. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 8, 519-529.
- Rothman, J.E. (1994)**. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*. 372, 55-63.
- Rothman, J.E. (1996a)**. The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Science*. 5, 185-194.
- Rothman, J.E., and Wieland, F.T. (1996b)**. Protein sorting by transport vesicles. *Science*. 272, 227-234.
- Rutkowski, D.T., and Hegde, R.S. (2010)**. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *The Journal Of Cell Biology*. 189, 783-794.
- Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., and Kaufman R.J. (2006)**. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biology*. 4.
- Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M., and Ferro-Novick, S. (2001)**. TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Molecular Cell*. 7, 433-442.
- Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kanemoto, S., Kondo, S., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ikawa, M., Okabe, M., and Imaizumi, K. (2009)**. Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nature Cell Biology*. 11, 1197-1204.
- Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kondo, S., and Imaizumi, K. (2007)**. A novel ER stress transducer, OASIS, expressed in astrocytes. *Antioxid Redox Signal*. 9, 563-571.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., and Ballabio, A. (2009)**. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*. 325, 473-477.
- Sato, K., and Nakano, A. (2007)**. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Letters*. 581, 2076-2082.
- Satoh, A., Wang, Y., Malsam, J., Beard, M.B., and Warren, G. (2003)**. Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure. *Traffic*. 4, 153-161.
- Scales, S.J., Pepperkok, R., and Kreis, T.E. (1997)**. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell*. 90, 1137-1148.
- Scott, C.C., Vacca, F., and Gruenberg, J. (2014)**. Endosome maturation, transport and functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 31, 2-10.
- Scott, K.L., Kabbarah, O., Liang, M., Ivanova, E., Anagnostou, V., Wu, J., Dhakal, S., Wu, M., Chen, S., Feinberg, T., Huang, J., Saci, A., Widlund, H.R., Fisher, D.E., Xiao, Y., Rimm, D.L., Protopopov, A., Wong, K., and Chin, L. (2009)**. GOLPH3 modulates mTOR signalling and rapamycin sensitivity in cancer. *Nature*. 459, 1085-1090.
- Schatz, G. (1998)**. The doors to organelles. *Nature*. 395, 439-440.
- Schekman, R., and Orci, L. (1996)**. Coat proteins and vesicle budding. *Science*. 271, 1526-1533.
- Schwaninger, R., Plutner, H., Bokoch, G.M., and Balch, W.E. (1992)**. Multiple GTP-binding proteins regulate vesicular transport from the ER to Golgi membranes. *The Journal Of Cell Biology*. 119, 1077-1096.
- Seabra, M.C., and Wasmeier, C. (2004)**. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Current Opinion in Cell Biology*. 16, 451-457.
- Seamon, K.B., Padgett, W., and Daly, J.W. (1981)**. Forskolin: unique diterpene activator of



adenylate cyclase in membranes and in intact cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 78, 3363-3367.

- Seemann, J., Jokitalo, E., Pypaert, M., and Warren, G. (2000).** Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature*. 407, 1022-1026.
- Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013).** Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nature Review. Molecular Cell Biology*. 14, 283-296.
- Shen, J., Snapp, E.L., Lippincott-Schwartz, J., and Prywes, R. (2005).** Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Molecular and Cellular Biology*. 25, 921-932.
- Shi, Q.J., Lei, Z.M., Rao, C.V., and Lin, J. (1993).** Novel role of human chorionic gonadotropin in differentiation of human cytotrophoblasts. *Endocrinology*. 132, 1387-1395.
- Shiba, Y., and Randazzo, P.A. (2012).** ArfGAP1 function in COPI mediated membrane traffic: currently debated models and comparison to other coat-binding ArfGAPs. *Histology and Histopathology*. 27, 1143-1153.
- Shore, G.C., Papa, F.R., and Oakes, S.A. (2011).** Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Current Opinion in Cell Biology*. 23, 143-149.
- Sonnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jamsa, E., Dirac-Svejstrup, B., and Warren, G. (1998).** A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *The Journal of Cell Biology*. 140, 1013-1021.
- Suh, J., and Hutter, H. (2012).** A survey of putative secreted and transmembrane proteins encoded in the *C. elegans* genome. *BMC Genomics*. 13, 333-350.
- Szkudlinski, M.W., Fremont, V., Ronin, C., and Weintraub, B.D. (2002).** Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiological Reviews*. 82, 473-502.
- Sztul, E., and Lupashin, V. (2009).** Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *FEBS letters*. 583, 3770-3783.
- Szul, T., and Sztul, E. (2011).** COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda)*. 26, 348-364.
- Szul, T., Grabski, R., Lyons, S., Morohashi, Y., Shestopal, S., Lowe, M., and Sztul, E. (2007).** Dissecting the role of the ARF guanine nucleotide exchange factor GBF1 in Golgi biogenesis and protein trafficking. *Journal of Cell Science*. 120, 3929-3940.
- Tang, B.L., Ong, Y.S., Huang, B., Wei, S., Wong, E.T., Qi, R., Horstmann, H., and Hong, W. (2001).** A membrane protein enriched in endoplasmic reticulum exit sites interacts with COPII. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 40008-40017.
- Tisdale, E.J., Bourne, J.R., Khosravi-Far, R., Der, C.J., and Balch, W.E. (1992).** GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *The Journal of Cell Biology*. 119, 749-761.
- Touchot, N., Chardin, P. and Tavitian, A. (1987).** Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84, 8210-8214.
- Travers, K.J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S. and Walter, P. (2000).** Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101.
- Trucco, A., Polishchuk, R.S., Martella, O., Di Pentima, A., Fusella, A., Di Giandomenico, D., San Pietro, E., Beznoussenko, G.V., Polishchuk, E.V., and Baldassarre, M., Buccione, R.,**

- Geerts, W.J., Koster, A.J., Burger, K.N., Mironov, A.A., and Luini, A. (2004).** Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nature Cell Biology*. 6, 1071-1081.
- Van den Hove, M.F., Croizet-Berger, K., Tyteca, D., Selvais, C., de Diesbach, P., and Courtoy, P.J. (2007).** Thyrotropin activates guanosine 5'-diphosphate/guanosine 5'-triphosphate exchange on the rate-limiting endocytic catalyst, Rab5a, in human thyrocytes in vivo and in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 92, 2803-2810.
- Van Heuverswyn, B., Streydio, C., Brocas, H., Refetoff, S., Dumont, J., and Vassart, G. (1984).** Thyrotropin controls transcription of the thyroglobulin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81, 5941-5945.
- Varki, A. (1998).** Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends in cell biology*. 8, 34-40.
- Vassart, G., and Dumont, J.E. (1992).** The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocrine Reviews*. 13, 596-611.
- Vellanki, R.N., Zhang, L., Guney, M.A., Rocheleau, J.V., Gannon, M., and Volchuk, A. (2010).** OASIS/CREB3L1 induces expression of genes involved in extracellular matrix production but not classical endoplasmic reticulum stress response genes in pancreatic  $\beta$ -cells. *Endocrinology*. 151, 4146-4157.
- Venkateswaran, A., Marsee, D.K., Green, S.H., and Jhiang, S.M. (2004).** Forskolin, 8-Br-3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate, and catalytic protein kinase A expression in the nucleus increase radioiodide uptake and sodium/iodide symporter protein levels in RET/PTC1-expressing cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89, 6168-6172.
- Vinson, C., Acharya, A., and Taparowsky, E.J. (2006).** Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1759, 4-12.
- Von Heijne, G. (1983).** Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European Journal of Biochemistry*. 133, 17-21.
- Walter, P., and Johnson, A.E. (1994).** Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 10, 87-119.
- Wandinger-Ness, A., Zerial, M. (2014).** Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. *Cold Spring Harbor Publications*. 6, a022616 First.
- Wang, P., Li, B., Zhou, L., Fei, E., and Wang, G. (2011).** The KDEL receptor induces autophagy to promote the clearance of neurodegenerative disease-related proteins. *Neuroscience*. 190, 43-55.
- Wang, W., Sacher, M., and Ferro-Novick, S. (2000).** TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *The Journal Of Cell Biology*. 151, 289-296.
- Ward, T.H., Polishchuk, R.S., Caplan, S., Hirschberg, K., and Lippincott-Schwartz, J. (2001).** Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *The Journal of Cell Biology*. 155, 557-570.
- Waters, M.G., Griff, I.C., and Rothman, J.E. (1991).** Proteins involved in vesicular transport and membrane fusion. *Current Opinion in Cell Biology*. 3, 615-620.
- Watson, P., Townley, A.K., Koka, P., Palmer, K.J., and Stephens, D.J. (2006).** Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic*. 7, 1678-1687.
- Weide, T., Bayer, M., Koster, M., Siebrasse, J.P., Peters, R., and Barnekow, A. (2001).** The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b.

EMBO Reports. 2, 336-341.

- Weide, T., Teuber, J., Bayer, M., and Barnekow, A. (2003).** MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins. . Biochemical and Biophysical Research Communications. 306, 79-86.
- Whyte, J.R., and Munro, S. (2002).** Vesicle tethering complexes in membrane traffic. Journal of Cell Science. 115, 2627-2637.
- Wild, K., Halic, M., Sinning, I., and Beckmann, R. (2004).** SRP meets the ribosome. Nature Structural & Molecular Biology. 11, 1049-1053.
- Wilson, C., Venditti, R., Rega, L.R., Colanzi, A., D'Angelo, G., and De Matteis, M.A. (2011).** The Biochemical Journal. Biochem 433, 1-9.
- Williams, D.B. (2006).** Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. Journal of Cell Science. 119, 615-623.
- Xu, D., and Hay, J.C. . (2004).** Reconstitution of COPII vesicle fusion to generate a pre-Golgi intermediate compartment. The Journal of Cell Biology. 167, 997-1003.
- Yang, M., Lei, Z.M., Rao, and Ch.V. (2003).** The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. Endocrinology. 144, 1108-1120.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T.L. (2012).** Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics. 13.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., and Schekman, R. (1993).** Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. Science. 259, 1466-1468.
- Yu, X., Breitman, M. and Goldberg, J. (2012).** A structure-based mechanism for Arf1-dependent recruitment of coatomer to membranes. Cell. 148, 530-542.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001).** Rab proteins as membrane organizers. Nature Reviews. Molecular Cell Biology. 2, 107-117.
- Zhang, K., and Kaufman, R. (2004).** Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. The Journal of Biological Chemistry. 279, 25935-25938.
- Zhang, K., Shen, X., Wu, J., Sakaki, K., Saunders, T., Rutkowski, D.T., Back, S.H., and Kaufman, R.J. (2006).** Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. Cell. 124, 587-599.
- Zhao, L., Helms, J.B., Brugger, B., Harter, C., Martoglio, B., Graf, R., Brunner, J., and Wieland, F.T. (1997).** Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatomer subunit beta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 94, 4418-4423.