

TESIS DOCTORAL

TRANSPORTE DE PROTEÍNAS EN LA VÍA SECRETORIA:

Caracterización funcional de la GTPasa Rab1b

Hernán Esteban Martínez Beladelli

Director de Tesis: Dra. Cecilia Inés Álvarez



Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

(CIBICI-CONICET)

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

2015

Comisión de Tesis

Dra. Cecilia Inés Álvarez (Director)

CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. José Luis Bocco

CIBICI-CONICET. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba.

Dr. Alfredo Lorenzo

INIMEC-CONICET. Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra.

Dr. Javier Valdez Taubas

CIQUBIC-CONICET. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Químicas.
Universidad Nacional de Córdoba.

Evaluador Externo

Dra. María Teresa Damiani

IHEM-CONICET. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Cuyo.

Agradecimientos

Ante todo, agradezco el apoyo económico brindado por CONICET, FONCyT y SECyT-UNC.

Este trabajo de tesis no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas, las cuales de una forma u otra contribuyeron desde lo profesional y lo personal. Un trabajo de investigación es siempre el fruto de ideas, proyectos y esfuerzos provenientes de numerosas personas. Es por eso que me gustaría manifestarles en este espacio mi profundo agradecimiento.

A mi Directora de tesis, la Dra. Cecilia Alvarez, por brindarme la oportunidad de trabajar en el laboratorio todos estos años, enseñándome el método científico y fundamentalmente formando en mí un criterio sólido que no sólo sirvió para resolver problemas experimentales sino que también me permitió tomar decisiones adecuadamente. En lo personal, quiero agradecer a Ceci por haberme escuchado y aconsejado en momentos difíciles, y por compartir mucho más que el trabajo cotidiano.

A la comisión de tesis, Dr. José Luis Bocco, Dr. Alfredo Lorenzo y Dr. Javier Valdez Taubas, por sus consejos y sugerencias, por orientarme y atender mis consultas, por su tiempo e ideas.

A la Dra. María Teresa Damiani por tomarse el tiempo de leer y evaluar el manuscrito de esta tesis.

A los demás directores del laboratorio 119-120, Dr. Patrino, Dr. Flury, Dr. José Luis Bocco, Dra. Susana Genti, Dra. Graciela Panzetta, Dr. José Echenique (Pepe), Dra. Claudia Sola, Dr. Alex Saka, por ayudarme con sus consejos y recomendaciones.

A mis compañeros del laboratorio 119-120, los que están y los que se fueron, por haber compartido tantos lindos momentos en congresos, juntas y fundamentalmente en el día a día del laboratorio, brindándome su apoyo tanto en cuestiones laborales como personales. Ellos son: Pablo, Nahuel, Ile, Sole, Vero, Andrea, Vivi, Germán, el flaco Ricardo, Paulo, Lucy, Sofi, Rodri, Lucas, Juan, Meli, Anita, Magui, Jesi, Ana Lía, Nubi, Ale Moyano, Seba, Gonza, Nico, Marianito, Mati, Flor.

En especial quiero agradecer al Dr. Gastón Soria, quien además de compañero considero un gran amigo. A pesar de que no hace mucho que lo conozco, hemos compartido muchas charlas (de todo tipo), asados y, lamentablemente, no mucho deporte (sólo póker). Gracias amigo por haberme ayudado en el "laburo" y, por supuesto, por tu amistad.

A mis compañeras de grupo Ale y Luci, las chicas, quienes fueron las que más me aguantaron en el laboratorio cuando los experimentos me jugaban una mala pasada y también en esos días en que los problemas personales nos desbordan. Gracias por la paciencia y la comprensión. También quiero darles las gracias por haber compartido tantas cosas lindas y espero que sigamos haciendo crecer esta amistad con el paso de los años.

Indice General

Resumen	1
Capítulo 1	3
Introducción	4
Estructura celular	4
Tráfico intracelular de proteínas	5
Vía secretoria	7
<i>Síntesis de proteínas y translocación al RE rugoso</i>	9
<i>Transporte entre el RE y el complejo de Golgi</i>	10
<i>Etapa final del transporte</i>	10
Proteínas que regulan el transporte de membranas en la vía secretoria	11
<i>Proteínas de cubierta (complejos COPII y COPI)</i>	11
<i>Proteínas de anclaje y fusión</i>	14
<i>La superfamilia de GTPasas Ras</i>	15
Proteínas Rab GTPasas	16
<i>Estructura y localización</i>	16
<i>Mecanismo de acción</i>	20
<i>Cascadas de Rab GEF y Rab GAP</i>	22
<i>Rab1b en la interfase RE-Golgi</i>	23
Ensayos de Time-lapse	24
Recuperación de la fluorescencia luego del foto-blanqueo (FRAP)	25
Brefeldina A (BFA) y Nocodazol (NOC)	26
Objetivos	29
Resultados	30
1. Análisis de la movilidad de Rab1b y efectores localizados en ERES o VTCs de manera simultánea para comprender la relación espacio-temporal de estas asociaciones	30

2. Cuantificación de la co-localización de Rab1b y efectores en diferentes condiciones de transporte	33
2.1. <i>Controles de cuantificación de co-localizaciones</i>	34
2.2. <i>Co-localización de Rab1b con diferentes compartimientos</i>	35
3. Estudio del tiempo de localización de Rab1b en estructuras COPII, y la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las mismas en diferentes condiciones de transporte	38
3.1. <i>Análisis del tiempo de asociación de Rab1b con ERES</i>	38
3.2. <i>Dinámica de asociación/disociación de Rab1b a membranas de ERES</i>	41
4. Evaluación de la relación espacio-temporal de la asociación de Rab1b con estructuras COPII durante el transporte anterógrado de cargo	43
Discusión	50
Capítulo 2	61
Introducción	62
Otras funciones de las Rab GTPasas	62
Rab1b y transducción de señales	63
Sistema tiroideo	64
Objetivos	68
Resultados	69
5. Implicancia de niveles incrementados de Rab1b en la secreción regulada de células secretorias de tiroides (FRTL5)	69
5.1. <i>Efecto de TSH en los niveles de Rab1b</i>	69
5.2. <i>Efecto de la inhibición de Rab1b en los niveles de NIS</i>	70
5.3. <i>Efecto de Rab1b en la expresión y la actividad promotora de NIS</i>	72
Discusión	76

Materiales y Métodos	79
Construcciones de plásmidos	80
Anticuerpos utilizados	80
Cultivo de líneas celulares	81
Transfección de líneas celulares	81
Células bacterianas	82
Preparación de bacterias competentes	83
Transformación de bacterias competentes	83
Ensayos de inmuno-fluorescencia (IF)	83
Citometría de flujo	84
Silenciamiento de la expresión de genes por ARN de interferencia	85
Ensayos de gen reportero-Actividad promotora de NIS	86
Ensayos de co-localización	87
Ensayos de microscopía <i>in vivo</i>	89
Tratamiento con Brefeldina A (BFA) y lavado de BFA	90
Tratamiento con Nocodazol (NOC)	90
Análisis cuantitativo de la relación espacio/temporal entre Rab1b y el cargo	91
Análisis estadístico de los datos	91
Abreviaturas	92
Bibliografía	96

Resumen

En células eucariotas, la selección e incorporación de las proteínas cargo ocurre en sitios especializados del Retículo Endoplásmico (ERES), y es llevada a cabo por proteínas del complejo de cubierta tipo COPII. Luego, en el compartimiento intermedio entre RE y Golgi (ERGIC o VTCs) se intercambia COPII por otro complejo de cubierta, COPI, y se originan conglomerados de vesículas y túbulos que se transportan e integran a las cisternas del cis-Golgi. La GTPasa Rab1b es esencial para el transporte anterógrado de proteínas y lípidos desde el Retículo Endoplásmico (RE) al complejo de Golgi, donde interacciona con múltiples proteínas (efectores) que integran la vía secretoria, como son los componentes del complejo COPII, proteínas relacionadas a COPI en los VTCs, y factores de anclaje o “tethering” tales como p115 y GM130, en VTCs y cis-Golgi, respectivamente. Aunque estas interacciones han sido bien caracterizadas, se desconoce la relación espacio/temporal de las mismas y su dinámica durante el transporte anterógrado de cargo. El objetivo principal de este trabajo es analizar los mecanismos moleculares que regulan diferentes eventos vinculados a la función de Rab1b en el transporte de proteínas del RE al Golgi. Los resultados se presentaron en 2 capítulos independientes: En el capítulo 1 se analizaron los mecanismos dinámicos de moléculas que contribuyen/participan en el “sorting” de cargo y su rol en la regulación de la transición ERES (COPII)-VTCs (COPI), mientras que en el capítulo 2 se analizó la implicancia que posee el incremento de los niveles de Rab1b en el proceso de secreción regulada de células secretorias de tiroides (FRTL5). Las asociaciones de Rab1b con Sec24 y Rab1b con p115 son mayoritariamente transientes, y sugieren que estas podrían ocurrir al mismo tiempo o de forma simultánea en etapas espacialmente distintas del transporte RE-Golgi. Además, se evidenció un incremento de la re-localización, tanto de p115 como de Rab1b, en los ERES, mientras que el tiempo de permanencia de Rab1b en estructuras COPII es dependiente del reclutamiento y/o actividad de GBF1 y del reclutamiento de COPI en la interfase de ERES-VTCs, sugiriendo que una vez que Rab1b interacciona con GBF1, necesitaría que esta se disocie para su posterior separación de los ERES. Por último, se observó que durante el transporte anterógrado, Rab1b se asocia de manera transitoria y en distintos momentos a todas las estructuras COPII estables para promover el “sorting” de cargo en los ERES.

Por otro lado, Rab1b se expresa de forma ubicua en tejidos humanos, sin embargo, en tejidos que poseen alta actividad secretoria, como tiroides, placenta y células epiteliales bronquiales, los niveles de ARNm de Rab1b se encuentran significativamente elevados. En presencia de la hormona estimulante de tiroides o tirotrópina (TSH), las células FRTL5 sintetizan y secretan

tiroglobulina (Tg) y una proteína de membrana transportadora de sodio y yodo (NIS). Se observó que la sobre-expresión de Rab1b incrementó los niveles proteicos de NIS incluso en ausencia de TSH. Además, se demostró que Rab1b modula la expresión de NIS regulando su actividad promotora, sugiriendo que en células y/o tejidos secretorios, un estímulo que promueve la secreción produciría un aumento en los niveles de Rab1b que activaría las vías de señalización que modulan la expresión de genes necesarios para la adaptación al estímulo.

Capítulo 1

Introducción

Estructura celular

A diferencia de las células procariotas, las eucariotas se caracterizan por poseer un alto grado de compartimentalización. Estas células organizan espacialmente sus diversas y numerosas funciones a través de un conjunto de estructuras membranosas conocido como **sistema de endomembranas (SE) o sistema vacuolar citoplasmático (SVC)**. Así, el núcleo se encarga de confinar el material genético en su interior mediante su envoltura nuclear, mientras que el citoplasma está integrado por un complejo de cisternas, vesículas y túbulos compuestos por una membrana cuya función es separar el interior de cada estructura, de la matriz citoplasmática.

El sistema de endomembranas de las células eucariotas involucra un conjunto de membranas internas que componen diversos compartimentos, denominados organelas, los cuales son funcional y estructuralmente distintos. Cada organela constituye una estructura especializada que cumple funciones específicas dentro de la célula mediante una gran variedad de proteínas y moléculas características.

Las siguientes organelas forman parte del sistema de endomembranas:

- El Retículo Endoplásmico (RE), constituye una extensión de la membrana nuclear y está compuesto por el RE liso y el RE rugoso, los cuales están involucrados principalmente en la síntesis de lípidos y proteínas, respectivamente.
- El complejo de Golgi, formado por un conjunto de sacos aplanados que tienen como principales funciones la modificación y secreción de proteínas hacia su destino final.
- Los lisosomas, vesículas formadas en el complejo de Golgi que se encargan de la digestión celular mediante una gran variedad de enzimas hidrolíticas y proteolíticas.
- Las vesículas, constituyen pequeñas unidades de transporte delimitadas que transfieren una gran variedad de moléculas entre distintos compartimentos.

En mamíferos, el sistema de endomembranas proporciona un sofisticado sistema de transporte que permite movilizar numerosas moléculas a través del interior celular hasta alcanzar sus ubicaciones intracelulares correctas. Además, permite la síntesis de lípidos y proteínas en superficies interactivas. El transporte de membranas regula la forma y composición molecular de cada organela. Además, 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. Para llevar a cabo esta importante tarea, las organelas intercambian constantemente sus membranas y proteínas de manera secuencialmente organizada, basándose en un mecanismo molecular subyacente que comprende numerosas proteínas. 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 et al., 2011).

Tráfico intracelular de proteínas

La mayoría de las proteínas son sintetizadas en los ribosomas, tanto los que se encuentran libres en el citosol como asociados al Retículo Endoplásmico (RE), y luego, para llevar a cabo sus funciones deben trasladarse específicamente a diferentes lugares, ya sea dentro o fuera de las células. Así, algunas proteínas son destinadas a formar parte de las organelas celulares o el citosol, mientras que otras se dirigen a la membrana plasmática o incluso al exterior celular. La especificidad que poseen dichas proteínas para alcanzar su lugar de destino, está proporcionada por una secuencia señal que permite la correcta localización de las mismas (Tabla 1).

Existen 3 mecanismos involucrados en transporte de las proteínas hacia el interior de cada organela, los cuales son: 1) Transporte desde el citosol hacia el interior del núcleo, a través de los poros nucleares; 2) Transporte desde el citosol hacia el interior del RE, mitocondrias y peroxisomas, mediante proteínas translocadoras localizadas en la membrana. La proteína tiene que desplegarse para atravesar la membrana; y 3) Transporte desde el RE hacia otros compartimientos de la vía secretoria, a través de vesículas que se fusionan con la membrana de otra organela, liberando así las proteínas dentro del nuevo compartimiento.

Tabla 1: Secuencias señal o diana que dirigen el tráfico de las proteínas hacia las organelas de destino (modificada de Gil Hernández et al., 2005).

Secuencia señal	Organela de destino
Péptido señal	Membrana del retículo endoplásmico
Secuencia amino terminal KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu)	Superficie luminal del retículo endoplásmico
Secuencia amino terminal (20-80 aminoácidos)	Matriz mitocondrial
Señal de localización nuclear (NLS) (por ej., Pro ₂ -Lys ₂ -Ala-Lys-Val)	Núcleo
Secuencia diana de la matriz peroxisomal (PTS) (por ej., Ser-Lys-Leu)	Peroxisomas
Manosa-6-fosfato	Lisosoma

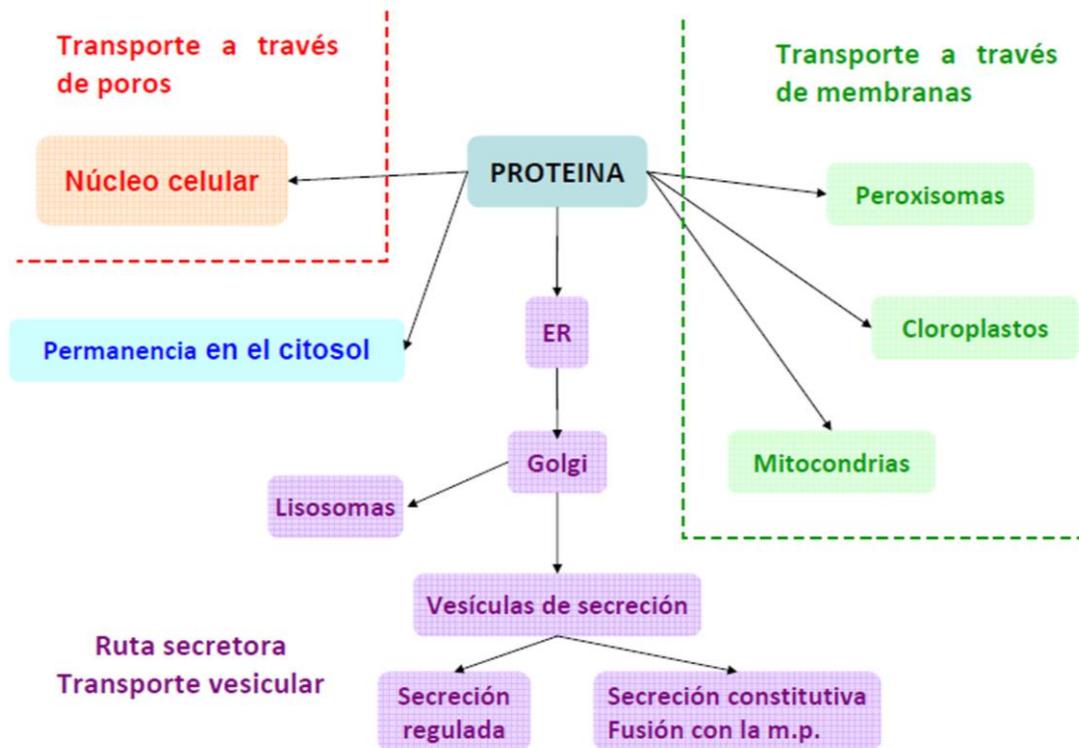


Figura 1: Transporte intracelular de proteínas

Mecanismos principales involucrados en el transporte de proteínas entre diferentes organelas.

Este último mecanismo constituye el transporte vesicular o de membranas, el cual se organiza en 2 vías muy importantes. La primera etapa involucra el transporte de vesículas desde el RE hacia el complejo de Golgi, y desde este compartimento hacia la membrana plasmática. Este proceso constituye la vía secretora, la cual es responsable principalmente de que las numerosas moléculas producidas por la célula sean liberadas al exterior. La vía

endosomal/lisosomal constituye la segunda etapa de este proceso y comienza en la membrana plasmática donde se forman vesículas, mediante endocitosis, fusionándose posteriormente con los endosomas, los cuales se convierten en lisosomas cuya función es degradar el material proveniente del medio extracelular (Figura 2). Ambas vías se encuentran balanceadas mediante un flujo bidireccional de membranas que involucra intermediarios de transporte responsables de llevar proteínas y membranas, de forma selectiva, desde un compartimiento a otro. Si bien estas vías son las más importantes, existen muchas otras que conectan distintas organelas mediante vesículas, las cuales permiten que todos los compartimientos se encuentren comunicados entre sí.

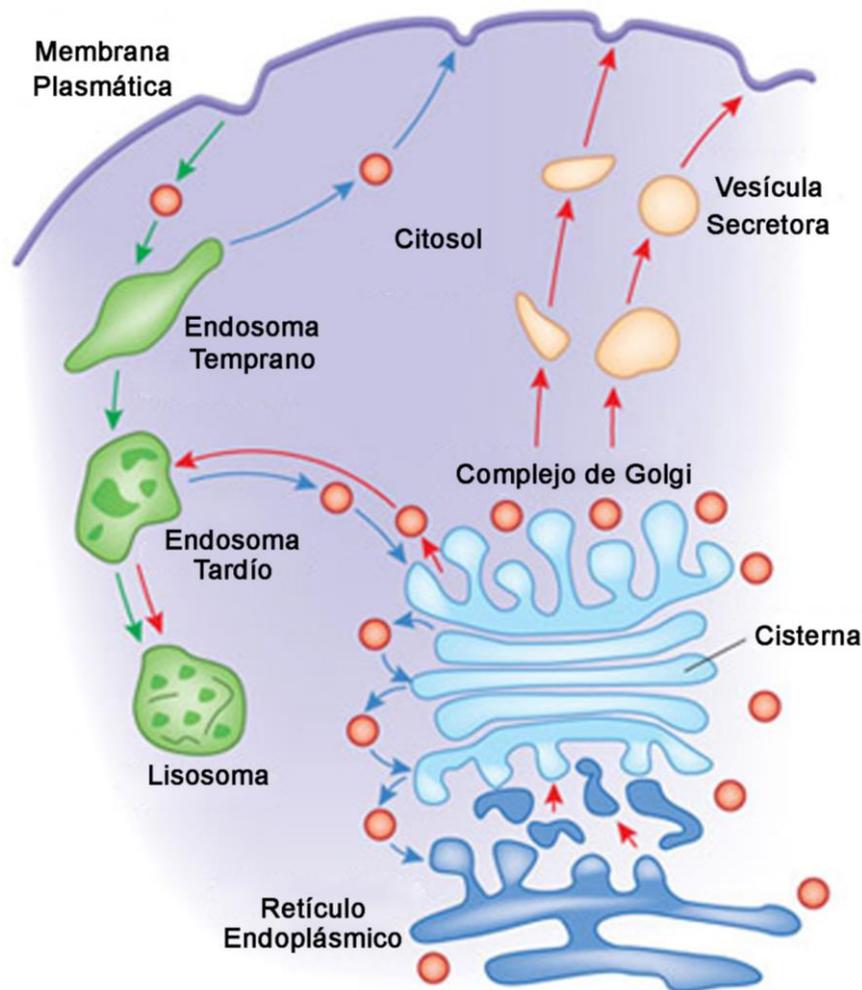


Figura 2: Transporte vesicular o de membranas

Este mecanismo de transporte está altamente organizado en 2 rutas principales, la vía secretora (flechas rojas) y la vía endosomal/lisosomal (flechas verdes) (modificada de Alberts et al., 2010).

El presente trabajo se enfoca en los mecanismos moleculares que regulan específicamente el transporte de proteínas desde el Retículo Endoplásmico al complejo de Golgi. Es por eso que se describirán detalladamente las etapas que conforman la vía secretoria.

Vía secretoria

La vía secretoria está constituida por organelas estructuralmente distintas, e intermediarios que participan en el movimiento secuencial de proteínas cargo a través de las mismas facilitando así el transporte entre ellas. Entre los compartimientos que componen la vía secretoria se encuentran: el Retículo Endoplásmico (RE), los sitios de salida del RE (ERES), el compartimento intermedio entre el RE y el complejo de Golgi (ERGIC), el complejo de Golgi, y la red del trans-Golgi (TGN) (Figura 3). Los endosomas se consideran compartimientos de esta vía debido a que participan en el transporte de proteínas cargo en algunos tipos celulares (Ang and Folsch, 2012).

Los componentes sintetizados en el RE son transportados, a través de la vía secretoria o exocítica, hacia otros compartimientos, como el complejo de Golgi y lisosomas, a la membrana plasmática y al medio extracelular. Los tipos de secreción principales son: 1) La secreción constitutiva, que tiene lugar en todas las células y a medida que se sintetizan lípidos y proteínas son transportados hasta el destino final; y 2) La secreción regulada, la cual sólo se manifiesta en presencia de una señal específica, como el ingreso de iones (calcio) o la interacción de una hormona con el receptor específico. De esta manera, en la secreción regulada, las moléculas sintetizadas se almacenan en vesículas o gránulos de secreción hasta que reciben la señal o estímulo apropiado. Este tipo de secreción se manifiesta en células de tejidos endócrinos y exócrinos, en macrófagos, y en algunas clases de leucocitos y neuronas.

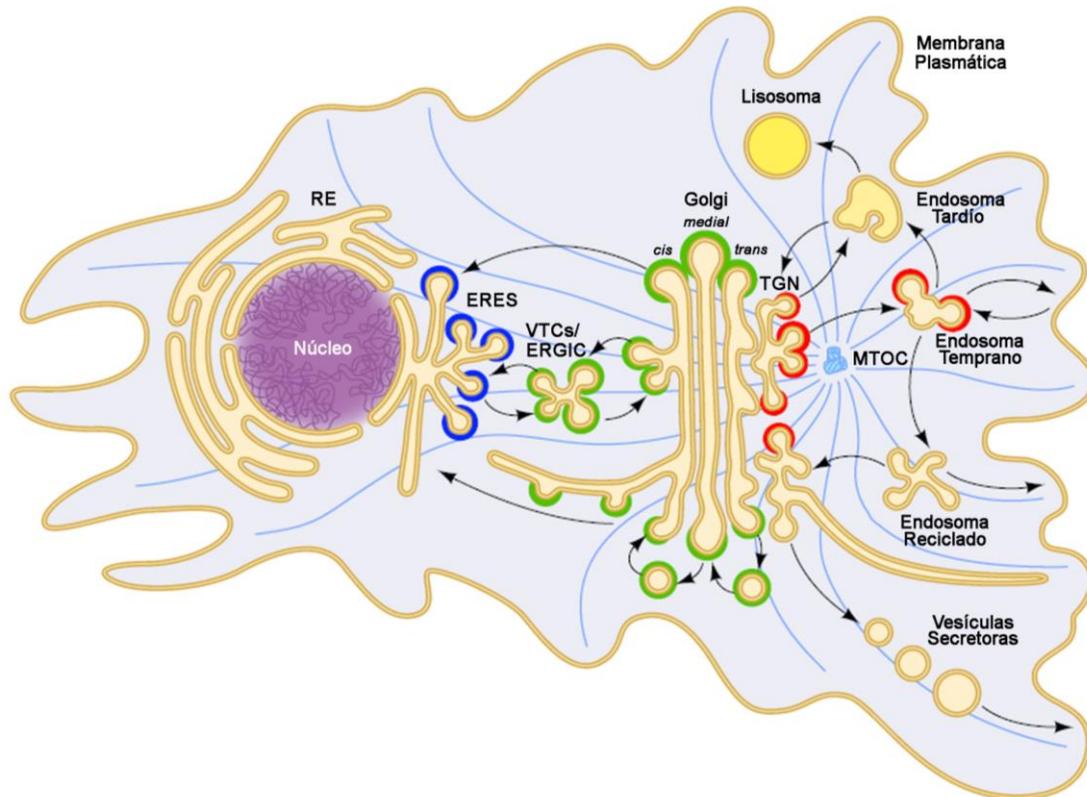


Figura 3: Vía secretoria de proteínas

El esquema representa los distintos compartimentos que componen la vía secretoria. Las diferentes etapas son indicadas mediante flechas. Los colores indican las distintas proteínas de cubierta: COPII (azul), COPI (verde) y Clatrina (rojo). La selección e incorporación de las proteínas cargo sintetizadas en el RE, ocurre en los ERES en vesículas recubiertas con COPII, y son transportadas al ERGIC o VTCs. El cargo viaja desde ERGIC, mediante vesículas recubiertas con COPI, hacia el complejo de Golgi. Una vez que atraviesa el Golgi, el cargo es exportado al TGN para dirigirse hacia la membrana plasmática (modificada de Szul and Sztul, 2011).

Síntesis de proteínas y translocación al RE rugoso

La primera etapa de la vía secretoria implica la síntesis y maduración de proteínas en el RE rugoso (RER). Estas proteínas están compuestas principalmente por glicoproteínas integrales de membrana, enzimas lisosomales y aquellas dirigidas hacia el medio extracelular. A diferencia de las proteínas citosólicas o las destinadas a mitocondrias y núcleo, las proteínas que son transportadas a través de la vía secretoria se caracterizan por poseer secuencias señales comunes (Blobel and Dobberstein, 1975). Esta señal se denomina péptido señal y consiste en una secuencia altamente hidrofóbica en el extremo N-terminal compuesta por aproximadamente 30 aminoácidos. Una vez que este péptido interacciona con una partícula de reconocimiento de señal denominada SRP (por Signal Recognition Particle en inglés), la transducción en el ribosoma se interrumpe temporalmente (Pfeffer and Rothman, 1987). En una etapa posterior el complejo es acoplado a sitios de anclaje de la membrana del RE,

permitiendo la separación de SRP con la consiguiente reanudación de la transducción. Así, la proteína es capaz de atravesar la membrana del RE a través de un canal o poro transmembrana conocido como translocón. La síntesis de la proteína y su translocación al RE son eventos simultáneos que constituyen un proceso co-transduccional caracterizado por la aparición de proteína en el lumen del RER a medida que ocurre la síntesis (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

El RER sintetiza 2 tipos principales de proteínas, las integrales de membrana y las solubles. Las primeras, se insertan y permanecen en la membrana del RE luego de haber terminado la síntesis en los ribosomas del RER. En algunos casos el péptido señal se encarga de anclar las proteínas a la membrana, mientras que en otros, secuencias de aminoácidos internas de la proteína funcionan como señal de anclaje que interrumpen su translocación al RE. Por otro lado, las proteínas solubles son translocadas directamente al lumen del RE debido a que su secuencia señal es escindida por una enzima, denominada peptidasa señal, que se encuentra en la parte luminal del RER. Una vez allí, siguen rápidamente su camino a través de la vía secretoria, salvo que se trate de proteínas residentes del RER (Wild et al., 2004; Thor et al., 2009).

En una etapa posterior a la síntesis, la mayor parte de las proteínas se modifican post-transduccionalmente en el RE, donde ocurren principalmente la formación de enlaces disulfuros y el agregado de carbohidratos (Varki, 1998). Mediante la acción de proteínas chaperonas, las proteínas son plegadas y ensambladas correctamente para que puedan ser transportadas a través de la vía secretoria (Hammond and Helenius, 1995; Ellgaard et al., 1999; Mothes et al., 1997).

Transporte entre el RE y el complejo de Golgi

El transporte de proteínas en la vía secretora comienza en regiones específicas del Retículo Endoplásmico denominadas sitios de salida del RE (**ERES**, por ER exit sites en inglés) (Lippincott-Schwartz et al., 1989; Bonifacino and Glick, 2004). En células eucariotas, la selección e incorporación de las proteínas cargo ocurre en los ERES y es llevada a cabo por proteínas del complejo de cubierta tipo II (COPII) (Barlowe et al., 1994; Matsuoka et al., 1998; Figura 3, círculos azules). La cubierta COPII induce la curvatura de la membrana y posterior formación de vesículas y/o túbulos (proceso llamado “budding” en inglés) (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003), que se fusionan entre ellos (fusión homotípica) para dar origen a una nueva estructura denominada ERGIC (por ER-Golgi intermediate compartment) o VTCs

(por vesicular tubular clusters), estructura que se identifica por la presencia del marcador ERGIC-53/58 (Hauri et al., 2000; Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003; Xu and Hay, 2004). En la interfase de ERES-VTCs se produce el intercambio de COPII por otro complejo de cubierta, COPI, que promueve la maduración de los VTCs (Aridor et al., 1995; Bannykh et al., 1996; Klumperman, 2000; Kreis et al., 1995; Figura 3, círculos verdes). La adquisición de la cubierta COPI no sólo permite el transporte anterógrado de los VTCs hacia el complejo de Golgi, sino que también promueve el transporte retrógrado, que permite que las proteínas residentes del RE, incorporadas en los VTCs, regresen nuevamente al RE (Lippincott-Schwartz and Smith, 1997; Presley et al., 1997; Scales et al., 1997; Stephens et al., 2000). El equilibrio del transporte (anterógrado y retrógrado) de membranas permite mantener el balance, la composición y la estructura de las organelas que integran la vía secretoria (Altan-Bonnet et al., 2004; Figura 3). Los VTCs se transportan hacia el Golgi e integran las cisternas cis del Golgi mediante un mecanismo dependiente de microtúbulos del citoesqueleto, los cuales están involucrados en generar las membranas pleomórficas características de los VTCs (Stephens, 2012).

Etapa final del transporte

Los intermediarios de transporte provenientes de los VTCs pierden la cubierta COPI antes de fusionarse con las membranas del complejo del Golgi (cis-Golgi). Una vez en el Golgi, las proteínas cargo son transportadas a través del mismo mediante un mecanismo que implica la maduración de las cisternas del mismo (Pelham, 2001; Glick and Nakano, 2009; Storrie and Nilsson, 2002).

El complejo de Golgi está compuesto por cisternas aplanadas (de 3 a 8 dependiendo del tipo celular) conectadas entre sí. Debido a que las mismas poseen enzimas específicas, son estructural y funcionalmente diferentes y pueden clasificarse en cis, medial y trans. Estas enzimas participan en modificaciones post-transduccionales de las proteínas de transporte a medida que atraviesan el complejo de Golgi (Altan-Bonnet et al., 2004). Además, se utilizan como marcadores de las distintas cisternas ya que se distribuyen de manera polarizada sobre estas. En resumen, el complejo de Golgi posee múltiples funciones, y a medida que se transportan numerosas moléculas, estas sufren secuencialmente distintas modificaciones mediante diversas reacciones para su posterior clasificación y distribución. Este proceso de maduración de las sustancias que atraviesan el Golgi consiste principalmente en la eliminación y adición de oligosacáridos o monosacáridos de las glicoproteínas sintetizadas en el RER, síntesis de heteropolisacáridos que se unen a proteínas específicas para formar moléculas más

complejas, síntesis de glicolípidos, reacciones de fosforilación, sulfatación y proteólisis (Farquhar and Palade, 1998).

Luego de atravesar las cisternas del Golgi, las proteínas cargo deben ser exportadas a través de una red túbulo-vesicular conocida como TGN (por Trans-Golgi Network en inglés) (Mironov et al., 2005). En este lugar son clasificadas y, posteriormente, empaquetadas en distintos tipos de vesículas donde la mayor parte de ellas se encuentran recubiertas por un complejo de proteínas de cubierta (Clatrina) que permite que las proteínas sean transportadas hasta su destino final (Mellman and Simons, 1992; Rodriguez-Boulán and Musch, 2005; Figura 3, círculos rojos).

Proteínas que regulan el transporte de membranas en la vía secretoria

Proteínas de cubierta (complejos COPII y COPI)

Los componentes de la cubierta tipo COPII están formados por un complejo de proteínas citosólicas, las cuales se ensamblan en los ERES para dar lugar a la formación de intermediarios de transporte de tipo vesicular, y también de tipo tubular (Kaiser and Schekman, 1990; Rexach et al., 1994). La cubierta COPII participa en la selección y concentración de proteínas cargo en los ERES a través de un proceso que involucra la deformación física de la membrana con la consiguiente formación de vesículas COPII (Barlowe et al., 1994; Bonifacino and Glick, 2004). Si bien estas vesículas pueden transportar grandes moléculas, generalmente poseen un tamaño de aproximadamente 60-90 nm (Barlowe et al., 1994; Bannykh et al., 1996; O'Donnell et al., 2011).

En los ERES se localiza Sec16, proteína que posee múltiples dominios, necesaria para el ensamblaje y la función de la cubierta COPII (Connerly et al., 2005; Hughes et al., 2009; Watson et al., 2006). Actualmente, existen modelos que sugieren que Sec16 establece una plataforma en los ERES que recluta COPII a través de múltiples interacciones con todas las subunidades de la cubierta (Barlowe and Miller, 2013). La cubierta COPII está formada por 2 heterodímeros, Sec23/24 y Sec13/31, y una GTPasa, denominada Sar1, la cual es activada por una proteína integral de la membrana del RE, Sec12, que posee actividad GEF (por Guanine Nucleotide Exchange Factor en inglés) (Barlowe and Schekman, 1993; Barlowe et al., 1994). En primera instancia Sar1-GDP es reclutada a los ERES, y mediante la acción de Sec12, intercambia el grupo GDP por GTP (Figura 4). Una vez que Sar1 es activada (se une a GTP), es responsable de reclutar al complejo Sec23/24 y, posteriormente, al heterodímero Sec13/31, que forma una capa externa que polimeriza en las membranas del RE y estabiliza al complejo proporcionando mayor rigidez a la cubierta (Schekman and Orci, 1996; Bhattacharya et al., 2012; Copic et al.,

2012). Sar1, Sec24 y Sec23 son responsables de la selección, concentración y empaquetamiento de las proteínas cargo en vesículas COPII debido a que interaccionan con dominios citosólicos de las mismas (Matsuoka et al., 1998; Giraudo and Maccioni, 2003; Mancias and Goldberg, 2008).

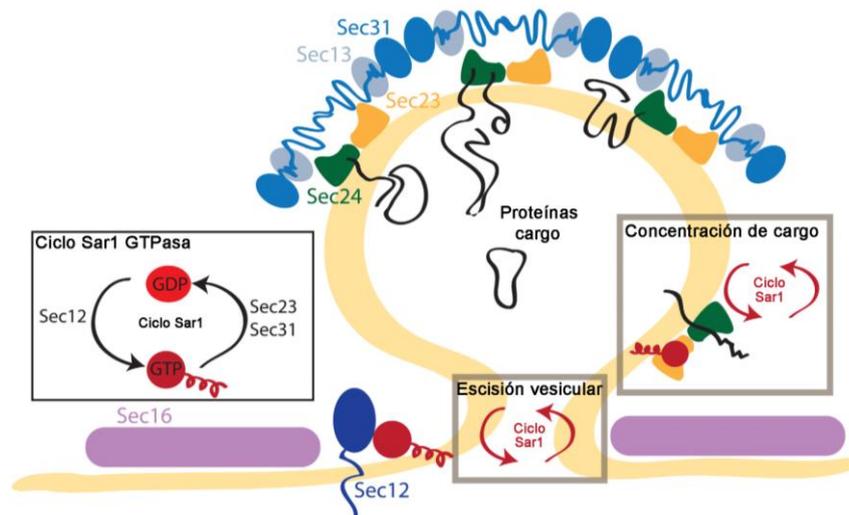


Figura 4: Formación de la cubierta COPII

El ensamblaje de la cubierta COPII en las membranas de los ERES implica la acción coordinada de una serie de componentes. Sec16 es necesaria para el ensamblaje posterior de COPII. Sar1-GDP es reclutada a las membranas mediante su GEF, Sec12, que intercambia GDP por GTP. Sar1-GTP recluta a su vez al complejo Sec23/Sec24 y luego el complejo Sec13/Sec31 para crear la cubierta y estabilizarla. El ciclo GTPasa de Sar1 (recuadro negro) es controlado por la GEF Sec12 y la proteína Sec23, que tiene actividad GAP, estimulada en parte por Sec31, sobre Sar1 (modificada de Miller and Barlowe, 2010).

Además, Sec23 actúa como una GAP (por GTPase-Activating Proteins en inglés), induciendo la hidrólisis del GTP unido a Sar1, lo que desencadena la disociación de la cubierta (Yoshihisa et al., 1993).

El complejo COPI no sólo participa en el transporte intra-Golgi (anterógrado y retrógrado), sino también en el transporte anterógrado y retrógrado en la interfase RE-Golgi mediante intermediarios que se originan en los VTCs (Beck et al., 2009). A partir de los VTCs, vesículas recubiertas con COPI se encargan de transportar: 1) hacia el RE, las proteínas residentes del mismo y aquellas mal plegadas unidas a chaperonas; y 2) hacia el Golgi, proteínas cargo de diferentes tamaños (Tang et al., 1995; Faini et al., 2012; Klumperman et al., 1998; Martinez-Menarguez et al., 1999; Scales et al., 1997; Stephens et al., 2000; Warren and Mellman, 1999). En ambos casos el movimiento de estas estructuras es dependiente de microtúbulos (Presley et al., 1997; Ben-Tekaya et al., 2005; Scales et al., 1997). Además, las vesículas COPI están involucradas en el mantenimiento estructural y funcional del complejo de Golgi (Bethune et al., 2006).

El complejo COPI está compuesto por 7 subunidades (coatómero) y una proteína con actividad GTPasa, Arf1 (por ADP-ribosylation factor 1 en inglés) (Malhotra et al., 1989; Waters et al., 1991). Los 7 polipéptidos son α , β , β' , γ , δ , ϵ , ζ -COP, los cuales se encuentran asociados, total o parcialmente, mientras permanecen en el citosol. El ensamblaje del complejo comienza cuando una GEF cataliza específicamente el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa Arf1. Una vez activada (Arf1-GTP), se une a membrana y promueve el reclutamiento de COPI (Donaldson et al., 1992; Helms and Rothman, 1992; Yu et al., 2012). Así, Arf1-GTP recluta al coatómero pre-ensamblado en el citosol, lo que origina la deformación y gemación de la membrana (Orci et al., 1993; Zhao et al., 1997). Si bien la curvatura inicial de la membrana es promovida por el coatómero, se requiere de la actividad de Arf1 para llevar a cabo la escisión de la membrana (Beck et al., 2011). Las vesículas COPI destinadas al RE contienen en su membrana diferentes variantes de la familia p24, mientras que las que participan en el transporte intra-Golgi poseen proteínas SNAREs (Szul and Sztul, 2011). Finalmente, una proteína GAP específica induce la hidrólisis de GTP unido a Arf1, promoviendo la disociación de la cubierta (Figura 5; Lee et al., 2004; Luo and Randazzo, 2008; Shiba and Randazzo, 2012; Szul and Sztul, 2011).

A lo largo de las distintas etapas del transporte, existen una gran variedad de GEF que catalizan específicamente el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa Arf1 (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). Una de ellas es GBF1 (por Golgi Brefeldin-resistant Factor en inglés), la cual se localiza en las membranas de VTCs y del cis-Golgi, y promueve el transporte de los intermediarios provenientes del RE (Kawamoto et al., 2002; Garcia-Mata et al., 2003). Específicamente, GBF1 cataliza el intercambio de GDP por GTP en Arf1 (Figura 5), mediante un dominio catalítico altamente conservado en eucariotas, conocido como SEC7 (Cherfils and Melancon, 2005). Si se interfiere su actividad GEF mediante una mutación puntual, E794K, se adquiere una proteína inactiva que actúa como una mutante dominante negativa; sin embargo, GBF1-E794K conserva la capacidad de asociarse a membranas (Garcia-Mata et al., 2003). La expresión de variantes GFP de GBF1-E794K causa disociación de COPI de las membranas y fragmentación del complejo de Golgi. Como consecuencia, se observa un patrón punteado similar al producido por Brefeldina A (BFA), donde las proteínas del Golgi se redistribuyen al RE y a estructuras punteadas periféricas (Garcia-Mata et al., 2003).

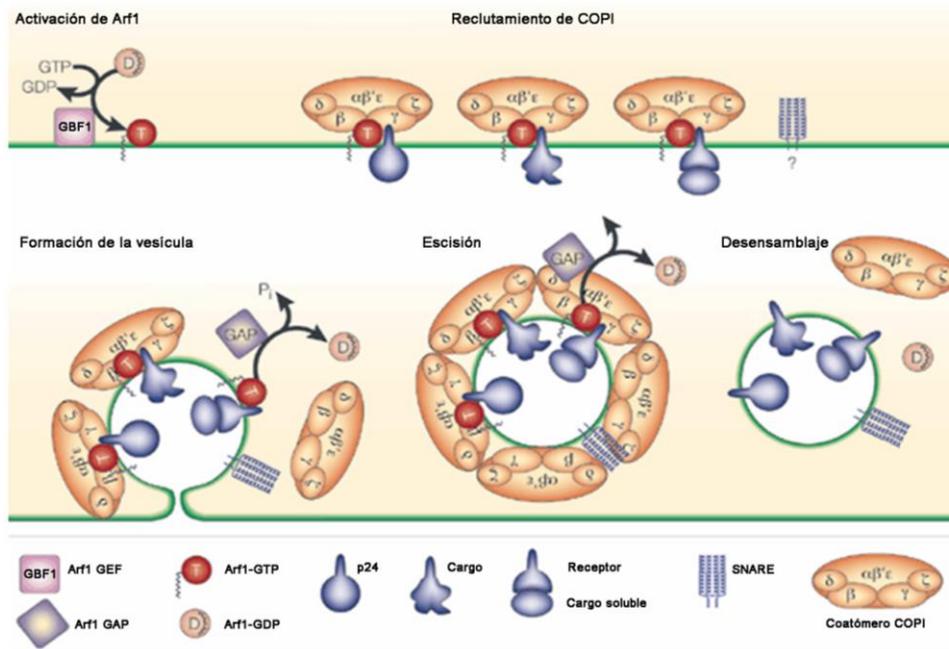


Figura 5: Formación de la cubierta COPI

La cubierta COPI está compuesta por la GTPasa Arf1 y un complejo proteico de 7 subunidades que se encuentra previamente ensamblado en el citosol (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ϵ - and ζ -COP). Arf1-GDP se activa a su forma unida a GTP mediante la acción de una proteína GEF que se encuentra en la interfase RE-Golgi, GBF1, y se asocia a membrana. Así, Arf1-GTP promueve el reclutamiento del complejo COPI y la formación de vesículas desde VTCs, que poseen distintas proteínas en su membrana según su destino, tales como cargo, p24, SNARE (modificada de Kirchhausen, 2000).

Proteínas de anclaje y fusión

Los intermediarios de transporte provenientes del RE, se acercan a la membrana de destino mediante eventos de reconocimiento específicos que conducen a un proceso de fusión altamente conservado (Lorente-Rodriguez and Barlowe, 2011). Así, 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). La célula posee mecanismos que inicialmente permiten el acercamiento de los intermediarios a la membrana blanco mediante proteínas de aproximación, anclaje o “tethering” (Sztul and Lupashin, 2009). Estas se encuentran en las membranas, tanto de los intermediarios de transporte como del compartimento receptor, e interaccionan con la misma a través de largos dominios citosólicos (Pfeffer, 1999; Waters and Pfeffer, 1999). Así, los factores “tethering” promueven el acercamiento del intermediario de transporte con la membrana receptora, y permiten la acción posterior de las proteínas de fusión conocidas como SNAREs (por soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) Association Proteins Receptors) (Figura 6). Uno de los factores “tethering” muy estudiado es la proteína p115, la cual interviene en el transporte RE-Golgi y promueve el acercamiento entre vesículas, tanto COPII como COPI, y las membranas

del cis-Golgi (Allan et al., 2000; Guo et al., 2008; Whyte and Munro, 2002). Además, p115 posee la capacidad de modular la función de las SNAREs y mantener la estructura y función del complejo de Golgi (Hong, 2005). P115 interactúa con Giantin y GM130, y en conjunto intervienen específicamente en la aproximación de las vesículas COPI a las membranas del cis-Golgi promoviendo su fusión (Sonnichsen et al., 1998; Diao et al., 2008; Linstedt et al., 2000).

Finalmente, las membranas donadora y receptora se acoplan mediante la acción específica de proteínas SNAREs, las cuales interactúan para anclar el intermediario de transporte a la membrana blanco, y promover así la correcta fusión entre ambos compartimientos (Figura 6).

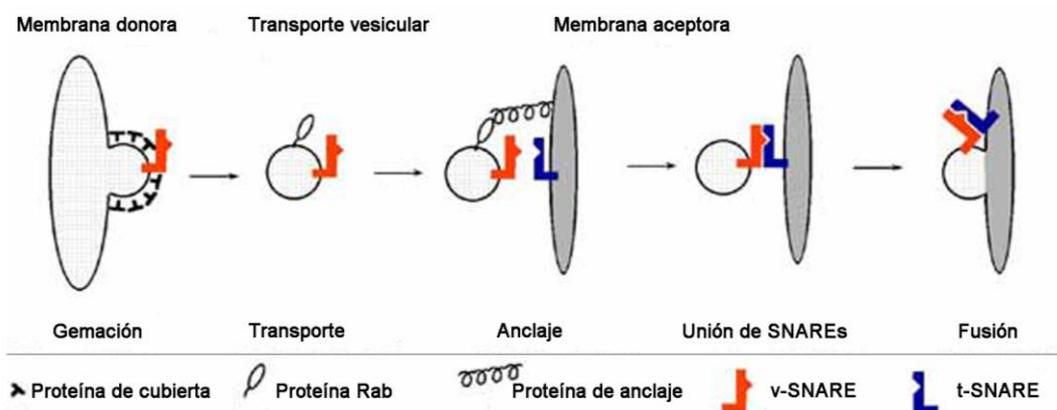


Figura 6: Etapas en el reconocimiento y fusión de membranas

Durante el proceso del tráfico de membranas, se forman intermediarios de transporte derivados de un compartimiento que son direccionados hacia la membrana del compartimiento aceptor. En ambas membranas se encuentran los factores de reconocimiento o "tethering" que promueven el acercamiento del intermediario de transporte con la membrana receptora, permitiendo la acción posterior de las proteínas de fusión conocidas como SNAREs (adaptada de Pelham, 2001).

La superfamilia de GTPasas Ras

Un grupo fundamental de proteínas que están involucradas en diversas funciones celulares es el integrado por la superfamilia RAS, también llamadas GTPasas pequeñas. Los miembros más estudiados de esta superfamilia son: Ras, Rho, Rab, Rac, Arf y Ran. Estas se encuentran en el citosol inactivas y poseen la capacidad de asociarse a diferentes membranas, donde tiene lugar su activación. Proteínas con actividad GEF son las encargadas de llevar a cabo la activación de las GTPasas intercambiando GDP por GTP, mientras que proteínas GAP están involucradas en la inactivación de las mismas ya que promueven su actividad hidrolasa intrínseca (Bos et al., 2007). Dentro de esta gran familia se encuentran las Rab GTPasas (Ras-like proteins in rat brain), las cuales poseen diferente localización subcelular y son componentes esenciales de la vía secretoria ya que regulan una gran variedad de procesos incluyendo formación de vesículas, desplazamiento de vesículas a lo largo de elementos del citoesqueleto, unión y

fusión de intermediarios de transporte con la membrana blanco mediante el reclutamiento de efectores específicos, entre otros (Bhuin and Ruy, 2014; Der and Balch, 2000; Goud et al., 1990; Pfeffer, 2001; Zerial and McBride, 2001).

Proteínas Rab GTPasas

En células eucariotas, las Rab GTPasas comprenden una de las mayores subfamilias de las pequeñas GTPasas. Estas están involucradas en el control y regulación del tráfico intracelular entre los distintos compartimientos mediante numerosos mecanismos moleculares que aseguran la fidelidad y eficiencia del transporte. Algunos de estos mecanismos implican la selección de cargo, formación de vesículas en un compartimiento donador, transporte de vesículas a lo largo de componentes del citoesqueleto, la asociación de vesículas a compartimientos aceptores específicos mediante diversos complejos “tethering”, y finalmente el mecanismo de fusión que involucra proteínas SNAREs. Cada una de estas etapas requiere un conjunto de proteínas específicas, incluyendo las Rab GTPasas, las cuales controlan el proceso y regulan la transición de una etapa a otra (Figura 6; Hutagalung and Novick, 2011).

Estructura y localización

Las Rab GTPasas se localizan en la cara citosólica de diversas membranas intracelulares. Si bien la mayoría de las proteínas Rab son de expresión ubicua en células humanas, algunas se expresan específicamente en un determinado tejido, como por ejemplo Rab3A que se expresa fundamentalmente en cerebro (Gurkan et al., 2005).

El número de Rab GTPasas involucrado en el transporte de membranas varía entre las diferentes especies. Hasta el momento se han caracterizado 11 Rab en levaduras (incluyendo Sec4 y las proteínas Ypt), y más de 60 proteínas Rab en mamíferos, las cuales regulan la vía secretoria interaccionando con diferentes proteínas denominadas efectores (Mizuno-Yamasaki et al., 2012; Pereira-Leal and Seabra, 2000; Stenmark and Olkkonen, 2001; Zerial and McBride, 2001; Tabla 2 y Figura 7). La mayoría de las proteínas Ypt tiene 1 o más homólogos putativos en mamíferos, y en algunos casos las Rab de mamíferos pueden funcionalmente reemplazar a sus homólogas en levaduras, demostrando así la conservación de la función de las proteínas dentro de los organismos eucariotas (Haubruck et al., 1989; Craighead et al., 1993; Singer-Kruger et al., 1995).

Las Rab GTPasas poseen un rol fundamental en la regulación del transporte de membranas en eucariotas. Si bien poseen una gran homología en sus secuencias, estas proteínas difieren

estructuralmente, lo que proporciona especificidad respecto a su función y localización (Pfeffer, 2005).

Las proteínas Rab poseen en su secuencia un sitio de fosforilación y un dominio conservado que está compuesto por una serie de motivos que se conocen como G1, G2, G3, G4 y G5. Sin embargo, se diferencian en su estructura principalmente en la región C-terminal ya que presentan secuencias hiper-variables de aproximadamente 35-45 aminoácidos que le confieren a cada una de las proteínas Rab, una función y localización subcelular específica. Además, esta secuencia sufre una modificación post-transduccional que consiste en la adición de grupos geranyl-geranyl o prenilo (Wennerberg et al., 2005).

Esta región C-terminal hipervariable está involucrada en la interacción de las proteínas Rab con algunos efectores. Por ejemplo, p115 requiere de la presencia del dominio hipervariable de Rab1b para poder asociarse a la misma, mientras que otro efector de Rab1b, GM130, es capaz de unirse a Rab1b en ausencia de este dominio (Aivazian et al., 2006). Además, la secuencia hipervariable de las diferentes Rab provee un mecanismo que implica la asociación a una determinada membrana (Chavrier et al., 1991). Si bien no existe un mecanismo general que explique cómo las proteínas Rab se asocian específicamente a una membrana, se sabe que múltiples regiones de las Rab, incluyendo el extremo C-terminal prenilado, contribuyen al reclutamiento de las mismas a la membrana (Ali et al., 2004). Además, existen evidencias basadas en el estudio de la familia de factores GEF de Rab, que indican que estas proteínas proveen la maquinaria mínima necesaria para la activación de Rab en una membrana específica. Así, el empleo de un sistema que induce la localización ectópica de diferentes GEF en la membrana de las mitocondrias, permite la activación específica de Rab1, Rab5, Rab8, Rab35 y Rab32/38 en esas membranas (Gerondopoulos et al., 2012; Blümer et al., 2013).

Tabla 2: Proteínas Rab GTPasas identificadas en mamíferos (modificada de Hutagalung and Novick, 2011).

Proteína Rab	Localización	Etapas de transporte/Función	Efectores
Rab1 (a y b)	RE, Golgi	RE-Golgi, intra-Golgi	P115/Usol, GM130, giantin, golgin84, GBF1
Rab2 (a y b)	RE, ERGIC, Golgi	RE-Golgi	INPP5B, golgin45, RIC19, GM130, GAPDH
Rab3 (a, b y c)	Vesículas secretorias, MP	Exocitosis, liberación de neurotransmisores	Rabin3, RIM1/2, Noc2, SNAP29, sinapsina
Rab3d	Vesículas secretorias, MP	Exocitosis, Exocitosis regulada en cél. No neuronales	
Rab4 (a y b)	Endosomas tempranos	Reciclado de proteínas, transporte hacia MP	CD2AP, D-AKAP2, RCP, rabaptin5, syntaxin4
Rab5 (a, b, y c)	MP, Clatrina, endosomas tempranos	Fusión de endosomas tempranos	EAA1, rabex5, OCRL1, PI3K, APPL1/2
Rab6 (a y a')	Golgi	Endosoma-Golgi, intra-Golgi, Golgi-RE	RIP1/2A/2B, Cog6, GCC185, giantin, OCRL1,
Rab6b	Golgi	Intra-Golgi en cél. neuronales	ELKS, INPP5B, golgin97, golgin245
Rab7a	Endosomas tardíos, lisosoma/vacuola, melanosomas y fagosomas	Endosoma tardío-lisosoma	Complejo Vps 35/29/26, rabring7, Vps34/p150 PI3K
Rab7b	Lisosomas	Endosoma tardío-lisosoma	Complejo kinasa, RILP
Rab8 (a y b)	Membrana celular, vesículas, cilia primaria	Exocitosis, TGN/endosoma de reciclado-MP	MICAL1, RIM1/2, Noc2, OCRL1, Sro7 (sec4)
Rab9 (a y b)	Endosomas tardíos, Golgi	Endosomas-TGN	TIP47, INPP5B, GCC185, HPS4
Rab10	Golgi, endosomas, vesículas GLUT4	Exocitosis, TGN/endosoma de reciclado-MP	Rim1, MICAL1, MICAL-L1, JRAB/MICAL-L2
Rab11 (a y b)	Golgi, endosomas de reciclado, endosomas tempranos	TGN/endosoma de reciclado-MP	Sec15, Rab11/FIP1-FIP5, rabin3, sec2, gyp1
Rab12	Golgi, vesículas secretorias	Exocitosis	RILP-L1
Rab13	TGN, endosomas de reciclado y "tight junctions"	TGN/endosoma de reciclado-MP	MICAL1, JRAB/MICAL-L2, PKA, INPP5B, OCRL1
Rab14	Golgi, endosomas tempranos, vesículas GLUT4	TGN/endosoma de reciclado-MP, orientación membrana apical	FIP2, RCP, Rip11, D-AKAP2
Rab15	Endosomas tempranos y de reciclado	"Sorting" endosomas/endosoma de reciclado-MP	MICAL1, JRAB/MICAL-L2, proteína efectora de Rab15
Rab17	Endosoma de reciclado	Transcitosis	
Rab18	Golgi, cuerpos lipídicos	Formación de cuerpos lipídicos	
Rab19	Golgi	ND	D-AKAP2, Wdr38
Rab20	Golgi, endosomas	Reciclado de membrana apical	INPPSE
Rab21	Endosomas tempranos	Transporte endosomal	Subunidad α -Integrina

Proteína Rab	Localización	Etapas de transporte/Función	Efectores
Rab22a	Endosomas tempranos	Transporte endosomal, reciclaje de proteínas hacia MP	Rabex5, EEA1, RAD51
Rab23	MP, endosomas	Transporte/reciclaje de proteínas hacia MP	
Rab24	RE	Formación de autofagosomas	Proteína1 de unión al C-terminal
Rab25	Endosomas de reciclado	Endosomas de reciclado (apical)-MP	Subunidad β 1-Integrina, FIP2, Rip11
Rab26	Gránulos secretorios	Exocitosis	RIM1
Rab27 (a y b)	Melanosomas	Exocitosis	Slp15, Slac2a/b, Rim2
Rab30	RE, golgi	ND	Cog4, Golga4/p230
Rab31 (Rab22b)	TGN, endosomas	Transporte del receptor M6P hacia endosomas	OCRL1
Rab32	Mitocondria, melanosomas		Varp/Ankrd27, PKA
Rab33a	Golgi, vesículas "dense-core"	Formación de autofagosomas	ATG16L, GM130, rabex5, rabatin5
Rab33b	Golgi	Formación de autofagosomas	
Rab34	Golgi, macropinosomas	Intra-Golgi, localización de lisosoma	Hmunc13, RILP, RILP-L1
Rab35	MP, endosomas	Endosoma de reciclado-MP, ensamblaje de actina	MICAL-L1, MICAL1, OCRL1, fascin
Rab36	Golgi	ND	MICAL1, MICAL-L1, RILP, RILP-L1
Rab37	Gránulos secretorios	Exocitosis	RIM1
Rab38	Melanosomas	TGN-melanosoma	Varp/Ankrd27
Rab39	Golgi	ND	Caspasa1
Rab40a	Golgi, endosomas de reciclado	Endosoma/transporte intracelular	Elongin B/C, Cullin5, D-AKAP2, RILP-L1, RME8
Rab40 (b y c)	Golgi, endosomas de reciclado		
Rab41	Golgi	ND	Cog6, Golga4/p230, D-AKAP2
Rab43	RE, Golgi	RE-Golgi, transporte de toxina Shiga	ND
Rab45	Región perinuclear	ND	ND

ND, no determinado; RE, retículo endoplásmico; TGN, trans-Golgi network; MP, membrana plasmática

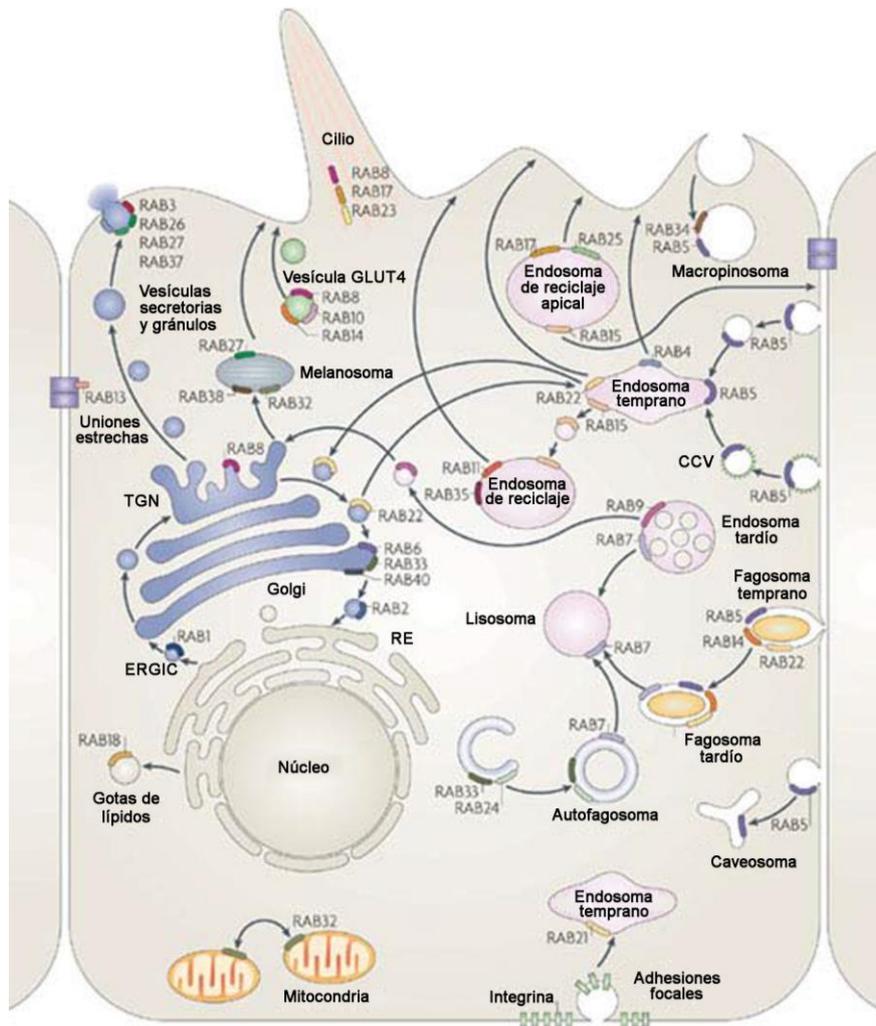


Figura 7: Localización intracelular de las Rab GTPasas

Esquema de una célula típica que muestra la localización intracelular de las distintas Rab GTPasas, y las vías de transporte vesicular asociadas (modificada de Stenmark, 2009).

Mecanismo de acción

Las proteínas Rab ciclan entre el citosol y las membranas de los compartimentos que integran diferentes etapas del transporte (Figura 8). Este ciclo permite controlar espacial y temporalmente la actividad de Rab y es regulado por una gran cantidad de factores. La asociación de Rab en membrana es reversible, y depende de una modificación post-traducciona que permite el agregado de 1 o 2 grupos geranil-geranil (o prenilo) altamente hidrofóbicos a residuos cisteínas en la región C-terminal (Desnoyers et al., 1996; Anant et al., 1998). Una vez que la proteína Rab es sintetizada, forma un complejo con un componente accesorio denominado REP (por Rab Escort Protein en inglés), el cual está asociado al núcleo catalítico de la enzima GGT II (por Geranil-Geranil Transferase en inglés) que cataliza la adición de 1 o 2 grupos lipídicos geranil-geranil al extremo C-terminal de la Rab (Seabra et al., 1993;

Alexandrov et al., 1994; Desnoyers et al., 1996). Luego, la proteína Rab prenilada es removida del núcleo catalítico mediante la acción de REP, y se mantiene soluble en el citosol en su forma unida a GDP, gracias a la asociación de una proteína chaperona denominada GDI (por GDP Dissociation Inhibitor en inglés) (Garrett et al., 1994; Shisheva et al., 1999, Figura 8). La asociación de las proteínas Rab a la membrana se lleva a cabo cuando la proteína GDI es desplazada por proteínas integrales de membrana denominadas GDF (por GDI Dissociation Factors en inglés; Pfeffer and Aivazian, 2004)). Así, el grupo prenilo permite la subsecuente asociación de Rab a las membranas (Collins, 2003; Sivars et al., 2003). Una GEF actúa sobre la proteína Rab insertada en la membrana, para convertir la forma “inactiva” unida a GDP en la forma “activa” unida a GTP (Figura 8). Una vez activa, la Rab es capaz de interactuar con proteínas efectoras que específicamente facilitan el transporte a lo largo de las distintas etapas de la vía secretoria (Takai et al., 2001; Segev, 2011). Luego de la interacción con efectores, las proteínas Rab hidrolizan el GTP unido y se liberan de las membranas en un mecanismo, mediado por una proteína GAP (por GTPase Activating Protein en inglés) que induce la actividad GTPasa intrínseca de las Rab (Cuif et al., 1999). Una vez inactivada por las GAP específicas, la Rab en su forma unida a GDP puede ser extraída de la membrana por GDI y reciclada nuevamente al citosol, donde permanece como un complejo estable hasta que comienza un nuevo ciclo, esta vez prescindiendo de la etapa de prenilación mediada por REP (Figura 8).

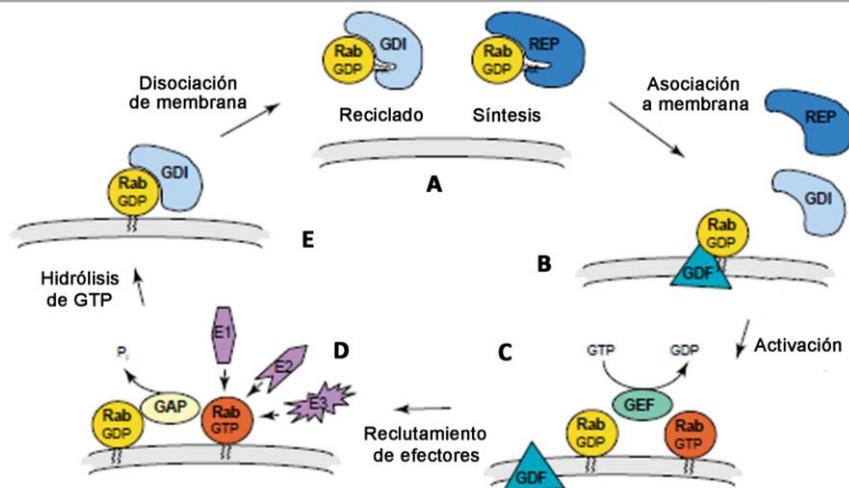


Figura 8: Ciclo de las Rab GTPasas

El mecanismo general de acción de las Rab GTPasas se resume en las siguientes etapas: (A) la proteína Rab sintetizada forma un complejo con REP, el cual promueve su prenilación mediante la enzima GGT II; (B) REP remueve a la Rab prenilada para que la proteína GDI mantenga a Rab en el citosol en su forma unida a GDP. Luego, GDI es desplazada por proteínas integrales llamadas GDF, permitiendo que Rab se asocie a las membranas; (C) Allí, una GEF intercambia GDP por GTP para activar a Rab; (D) Luego de interactuar con distintos efectores, una proteína GAP cataliza la hidrólisis de GTP; y (E) GDI promueve la disociación de Rab de las membranas y se inicia un nuevo ciclo donde la etapa de prenilación mediante REP ya no es necesaria (adaptada de Seabra and Wasmeier, 2004).

Cascadas de Rab GEF y Rab GAP

Cada Rab exhibe un patrón distinto de localización subcelular (Zerial and McBride, 2001; Pfeffer and Aivazian, 2004). Mediante el reclutamiento de un único conjunto de efectores, las proteínas Rab regulan el transporte de membranas a través de los compartimentos con los que se asocian (Grosshans et al., 2006). Las cascadas de las Rab GEF constituyen un grupo de efectores ampliamente descrito donde una Rab, en su forma unida a GTP, es capaz de reclutar a la GEF que activa a la siguiente Rab (Ortiz et al., 2002; Rink et al., 2005). Este mecanismo involucra la activación secuencial de una serie de proteínas Rab a lo largo de la vía secretoria, mientras que una cascada de Rab GAP trabaja en sentido opuesto involucrando la activación de una Rab que recluta a una proteína GAP en las membranas para inactivar a la Rab precedente (Rivera-Molina and Novick, 2009; Pfeffer, 2013; Figura 9). De esta manera, las cascadas de Rab GEF trabajan en conjunto con las cascadas de Rab GAP para regular el transporte de membranas en la vía secretoria.

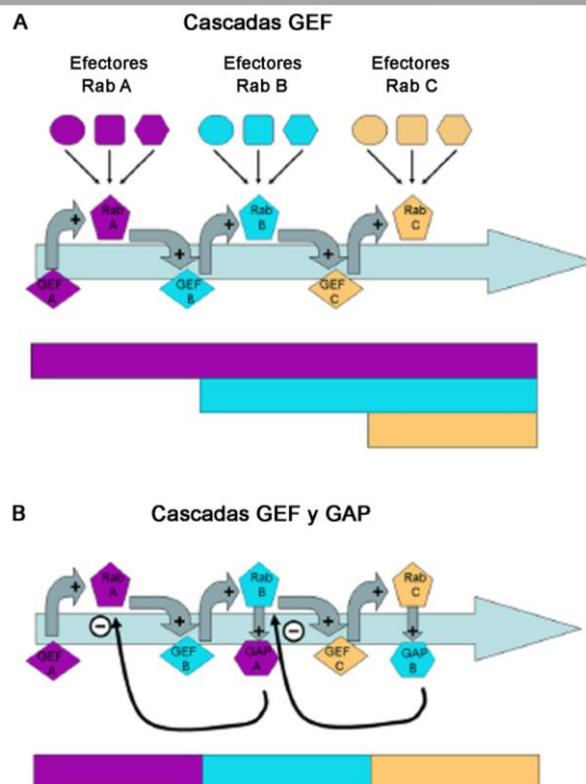


Figura 9: Cascadas de Rab GEF y Rab GAP

(A) El modelo de las cascadas GEF establece la activación secuencial de distintas Rab en la vía secretoria (Rab-A recluta a la GEF de B, Rab-B recluta a la GEF de C). Las barras de colores (abajo) indican cómo las distintas Rab (y sus efectores) se mezclan en la membrana mediante este mecanismo. (B) Mecanismo de las cascadas GAP que actúan en contracorriente a las cascadas GEF (Rab-B recluta a la GAP de A, Rab-C recluta a la GAP de B). Las barras de colores (abajo) señalan cómo la adición de las cascadas GAP reduce la mezcla de las Rab, y promueve la localización específica de sus efectores a lo largo de la vía (adaptada de Rivera-Molina and Novick, 2009).

Rab1b en la interfase RE-Golgi

Las Rab GTPasas son fundamentales para que los compartimientos conectados por transporte vesicular funcionen adecuadamente debido a que controlan la “fidelidad” de la fusión de las vesículas con la membrana de destino. Particularmente, la GTPasa Rab1 coordina la primera etapa de la vía secretoria, regulando el transporte y fusión de membranas en la interfase RE-Golgi (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). Hasta el momento se han caracterizado 2 isoformas de Rab1, Rab1a y Rab1b, las cuales poseen secuencias altamente homólogas y funciones similares a pesar de las pequeñas diferencias entre sus secuencias. Es más, se ha propuesto que sus funciones podrían ser intercambiables (Nuoffer et al., 1994). Si bien ambas regulan el transporte de proteínas en la interfase RE-Golgi (Schwaninger et al., 1992), recientemente se ha demostrado que Rab1a es también un importante regulador del “sorting” de múltiples cargo en endosomas tempranos (Mukhopadhyay et al., 2014).

Debido a que el presente trabajo se enfoca en el estudio de la GTPasa Rab1b, su descripción se realizará más detalladamente.

Rab1b es esencial para el transporte de proteínas desde el RE al Complejo de Golgi regulando dicha etapa del transporte mediante la interacción con diferentes proteínas efectoras (Tisdale et al., 1992). La primera etapa del transporte involucra la formación de vesículas mediado por la cubierta COPII. En levaduras, Sec23, interacciona con un complejo de proteínas denominado TRAPPI (por TRansport Protein Particle en inglés), 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 “tethering” y la fusión de estas vesículas con las membranas del Golgi (Jones et al., 2000; Cai et al., 2008; Sacher et al., 2001; Wang et al., 2000). Así, Sec23 interactúa con TRAPPI, entre otros efectores, para asegurar la direccionalidad del tráfico RE-Golgi, y prevenir así la fusión de vesículas COPII con el RE (Lord et al., 2011). 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). Además, la cubierta COPII tiene una estructura de red abierta lo que permite que Rab1 se aproxime y finalmente se inserte en la membrana (Faini et al., 2013). Finalmente, Rab1 activada es capaz de reclutar proteínas efectoras como p115 que promueven el reconocimiento de las vesículas provenientes del RE y la fusión con la membrana de destino mediada por proteínas SNAREs (Cao et al., 1998; Shorter et al., 2002).

Por lo tanto, Rab1b interacciona con proteínas del complejo COPII, de VTCs y del complejo de Golgi (Allan et al., 2000; Alvarez et al., 2003; Moyer et al., 2001; Satoh et al., 2003). Datos

previos indican que Rab1b interacciona con proteínas localizadas en ERES, co-localizando con componentes de COPII, como Sec31 y Sec24, en estructuras periféricas. Mediante esta interacción, Rab1b participa en el “sorting” de cargo en ERES (Slavin et al., 2011). En VTCs, Rab1b interacciona y co-localiza con p115 en estructuras periféricas (Allan et al., 2000). Además, Rab1b está involucrada en el reclutamiento de GBF1 en las membranas de los VTCs, la cual a su vez promueve el reclutamiento del complejo COPI y la consiguiente maduración de VTCs (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). El mecanismo involucrado en el reclutamiento de Rab1b implica a p115, la cual actúa como una proteína GDF promoviendo el desplazamiento de la proteína GDI y, como consecuencia, permite la asociación de Rab1b a las membranas de los VTCs (Guo and Linstedt, 2013). La participación de Rab1b en eventos previos a la fusión de membranas al complejo de Golgi es mediada por su interacción con diferentes factores de contacto o “tethering” tales como p115, GM130 y Golgin 84 (Allan et al., 2000; Satoh et al., 2003; Weide et al., 2001).

Los estudios de co-localización de Rab1b y sus efectores presentes en diferentes estructuras (COPII, VTCs y el complejo de Golgi) se han realizado mayoritariamente en células fijadas, en estado estacionario. Sin embargo, debido a que se desconoce la relación espacio-temporal de estas interacciones y la dinámica de las co-localizaciones en diferentes condiciones de transporte, en este trabajo abordaremos el estudio de dichos aspectos.

Ensayos de Time-lapse

El “Time-lapse” es una técnica frecuentemente utilizada en fotografía que consiste en tomar sucesivas imágenes en intervalos de tiempo iguales y durante un determinado período de tiempo, para luego montar un video con las mismas.

Esta metodología ha sido utilizada para comprender cómo funcionan las proteínas mencionadas en el transporte RE-Golgi, debido a que permite evaluar el comportamiento dinámico o la movilidad de proteínas en células eucariotas. En general, esta metodología utiliza construcciones donde la proteína de interés se expresa fusionada a una proteína fluorescente verde (GFP, por Green Fluorescent Protein en inglés) o a variantes de la misma. Las proteínas GFP han sido usadas como reporteras de la expresión de genes, rastreadores de linajes celulares, y como etiquetas fusionadas a distintas proteínas para monitorear su localización en células vivas (Cubitt et al., 1995). Por lo tanto, empleando microscopía de fluorescencia, es posible identificar a la proteína de fusión en forma directa en células vivas. Además de los ensayos de “Time-lapse”, los cuales constituyen una de las metodologías más utilizadas (Lippincott-Schwartz et al., 1999), la técnica de recuperación de la fluorescencia

luego del foto-blanqueado (FRAP, por Fluorescence Recovery After Photobleaching en inglés) también ha sido de gran utilidad para comprender la función de numerosas proteínas (Presley et al., 2002).

Los ensayos de “Time-lapse” permiten analizar la movilidad o desplazamiento de marcadores subcelulares que se asocian a las membranas de distintas estructuras de células vivas. Para ello, se toman imágenes de los diferentes marcadores a intervalos iguales durante un determinado tiempo y se monta un video con las mismas (ver Materiales y Métodos). Así, los ERES marcados con GFP-Sec13 o GFP-Sec23 (componentes de la cubierta COPII) son relativamente inmóviles y de larga vida o estabilidad, mientras que los VTCs marcados con GFP-p58 son altamente móviles y presentan un desplazamiento hacia el complejo de Golgi (Stephens et al., 2000; Kirk and Ward, 2007). De manera interesante, estudios de la movilidad o desplazamiento de estructuras punteadas marcadas con Rab1b-GFP muestran un comportamiento de características mixtas (similares a COPII y a VTCs; (Monetta et al., 2007). Si bien se han descrito tanto la función de Rab1b en los diferentes compartimientos, como las interacciones entre Rab1b y estructuras COPII (ERES) o p115 (VTCs), se desconoce la movilidad de Rab1b y dichas estructuras de manera simultánea. Analizar este aspecto nos permitirá comprender la relación espacio-temporal de las asociaciones de Rab1b con diferentes efectores durante la transición COPII-COPI.

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. Es importante tener en cuenta que luego del foto-blanqueado, se toma una imagen inicial (tiempo cero), en la cual se observa un porcentaje de recuperación con un determinado valor de intensidad de fluorescencia que dependerá principalmente de la combinación de dos efectos principales: 1) la eficiencia del foto-blanqueado de la muestra; y 2) la velocidad de recuperación de la fluorescencia que ocurre durante el tiempo en el cual se adquiere la primera imagen posterior al foto-blanqueado.

El porcentaje de recuperación de la intensidad de fluorescencia depende de la capacidad de una molécula de ser reemplazada por nuevas moléculas fluorescentes, las cuales se consideran móviles y provienen de una región externa a la región foto-blanqueada. Así, cuando se

recupera el 100% de la fluorescencia inicial, todas las moléculas son reemplazadas por nuevas moléculas fluorescentes (fracción móvil), mientras que si la recuperación es menor al 100% implica que existe una fracción de las moléculas que está inmovilizada en la región foto-blanqueada, sin que puedan ser reemplazadas por nuevas moléculas (fracción inmóvil) (Lippincott-Schwartz et al., 2001).

Por otro lado, un ensayo de FRAP permite determinar el tiempo en el cual se recupera la mitad de la fluorescencia inicial ($t_{1/2}$). Además, permite conocer el mecanismo involucrado en la asociación/disociación de la proteína analizada a una dada membrana. Así, proteínas que poseen $t_{1/2}$ cortos ciclan continuamente desde el citosol a las membranas, mientras que aquellas que presentan $t_{1/2}$ prolongados se asocian a las membranas mediante intermediarios de transporte dependientes de microtúbulos. Algunos ejemplos de proteínas con $t_{1/2}$ cortos son: Sec24, 35-45 segundos (Stephens et al., 2000; Slavin et al., 2011); Arf1, 15 a 45 segundos (Vasudevan et al., 1998; Presley et al., 2002); ϵ -COP, 20 a 30 segundos (Ward et al., 2001; Presley et al., 2002); GBF1, 15 a 40 segundos (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005); p115, 15 a 20 segundos (Brandon et al., 2006). Las proteínas p58 y GalT, en cambio, poseen $t_{1/2}$ prolongados de 15 minutos y 50 minutos, respectivamente (Ward et al., 2001).

Empleando ensayos de FRAP, ha sido posible evaluar la importancia que poseen algunas proteínas para regular la dinámica de otras. Así, se ha reportado que Rab1b modula la dinámica de asociación/disociación de p115 a las membranas y de COPII a las membranas de ERES (Brandon et al., 2006; Slavin et al., 2011).

Brefeldina A (BFA) y Nocodazol (NOC)

Debido a que el empleo de Brefeldina A (BFA) y Nocodazol (NOC) constituye una herramienta fundamental para el estudio de la localización y la dinámica de una gran variedad de proteínas en la vía secretoria, analizaremos con más detalle sus efectos.

Ensayos que utilizan Brefeldina A (BFA) se han llevado a cabo para examinar detalladamente los mecanismos involucrados en las diferentes etapas del transporte anterógrado. BFA es un metabolito fúngico que inhibe la actividad GEF de GBF1, uniéndose al complejo Arf GDP-GBF1 *in vitro* (Peyroche et al., 1999). Como consecuencia, bloquea rápidamente el transporte anterógrado entre el RE y el Golgi sin afectar el transporte retrógrado desde el Golgi hacia el RE (Fujiwara et al., 1988; Graham et al., 1993; Lippincott-Schwartz et al., 1989). Debido a la acción de BFA, las proteínas del complejo de Golgi se redistribuyen al RE alterando así el

equilibrio del transporte, y dado a que el efecto de BFA es reversible, se considera que la salida o el transporte de estas proteínas (redistribuidas en el RE) está sincronizada/o.

Durante el tratamiento con BFA las proteínas de cubierta, como COPI, se disocian de las membranas del complejo de Golgi, y las proteínas del mismo presentan diferentes distribuciones (Klausner et al., 1992; Sciaky et al., 1997; Figura 10). Así, las enzimas de glicosilación GalNAct2 y SialT2 se redistribuyen en el RE evidenciando un patrón reticular, mientras que la proteína de matriz GM130 se distribuye en estructuras punteadas dispersas en el citoplasma (Miles et al., 2001). Además, marcadores de VTCs, como p115 y ERGIC53, se redistribuyen en estructuras punteadas similares a GM130. Es interesante el hecho de que BFA no altera la maquinaria de exportación desde el RE dependiente de COPII, permitiendo la formación y el “sorting” de diversas proteínas en el compartimiento post-ERES (VTCs inmaduros), e impidiendo el reclutamiento de GBF1 en los VTCs (Orci et al., 1993; Garcia-Mata et al., 2003; Lippincott-Schwartz et al., 2000; Figura 10). Así, GBF1 se relocaliza en el RE y COPI se redistribuye en el citosol, mientras que COPII no es afectada por BFA y por lo tanto permanece localizada en estructuras punteadas (Ward et al., 2001; Garcia-Mata et al., 2003). Además, antecedentes previos indican que Rab1b, que en estado estacionario se distribuye en estructuras punteadas y en las membranas del complejo de Golgi, luego del agregado de BFA se redistribuye únicamente en estructuras punteadas (Figura 10).

El efecto de BFA sobre las estructuras subcelulares es reversible. Si la BFA es removida, mediante el lavado de la misma, se permite la restitución del transporte hasta llegar a un equilibrio en donde las enzimas del complejo de Golgi llegan al mismo. Se considera que en las primeras etapas de lavado hay prácticamente sólo transporte anterógrado, y se sabe que las proteínas del Golgi (que emulan una proteína cargo) son concentradas en ERES de manera dependiente de Rab1b (Slavin et al., 2011). Teniendo en cuenta esto, el lavado de BFA es una estrategia que nos permitirá estudiar en células vivas, la relación espacial y temporal entre Rab1b y los distintos compartimientos que operan en la interfase RE-Golgi durante el transporte anterógrado de cargo.

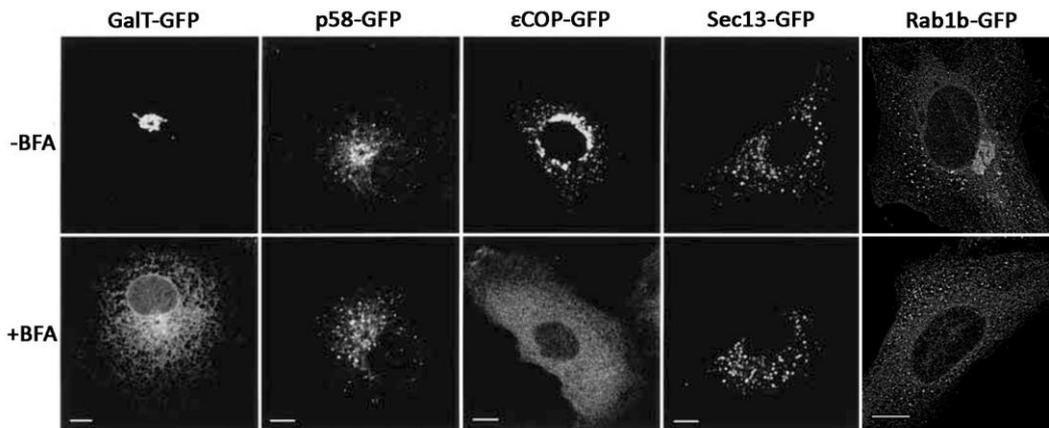


Figura 10: Efectos de BFA sobre distintas estructuras sub-celulares

Redistribución de distintas proteínas luego del tratamiento con BFA. GalT posee un patrón reticular y ε-COP se distribuye al citosol, mientras que p58, Sec13 y Rab1b presentan un patrón punteado distribuido en todo el citosol (modificada de Ward et al., 2001).

Nocodazol (NOC) es un agente que promueve la desorganización de microtúbulos de manera reversible, llevando a la fragmentación del Golgi y a la redistribución de las proteínas del Golgi hacia estructuras periféricas adyacentes a los ERES, conocidas como Golgi mini-stacks (Storrie et al., 1998; Ward et al., 2001). En esta condición, marcadores de ERES y VTCs parecen estar superpuestos, lo que indica que estos compartimientos se encuentran muy próximos entre sí (Hammond and Glick, 2000). Por lo tanto, si bien el tratamiento con NOC produce la fragmentación del Golgi, los compartimientos que participan en la interfase RE-Golgi (ERES, VTCs y Golgi mini-stacks) están muy próximos entre sí, y son capaces de llevar a cabo el “sorting” de cargo, el reclutamiento de COPI y el transporte anterógrado y retrógrado, similar a lo que ocurre en estado estacionario.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es analizar los mecanismos moleculares que regulan diferentes eventos vinculados a la función de Rab1b en el transporte de proteínas del RE al Golgi.

Objetivos Específicos

1. Analizar la movilidad de Rab1b y efectores localizados en ERES o VTCs de manera simultánea para comprender la relación espacio-temporal de estas asociaciones.
2. Analizar cuantitativamente la co-localización de Rab1b y efectores en diferentes condiciones de transporte.
3. Estudiar el tiempo de localización de Rab1b en estructuras COPII, y la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las mismas en diferentes condiciones de transporte.
4. Evaluar la relación espacio-temporal de la asociación de Rab1b con estructuras COPII durante el transporte anterógrado de cargo.

Resultados

1. Análisis de la movilidad de Rab1b y efectores localizados en ERES o VTCs de manera simultánea para comprender la relación espacio-temporal de estas asociaciones

Como se mencionó anteriormente, ensayos de “Time-lapse” realizados con variantes de GFP de marcadores de ERES y VTCs, han permitido analizar la movilidad de estas estructuras. De esta manera, se determinó que las estructuras marcadas con COPII (marcador de ERES) son relativamente inmóviles y estables, mientras que las estructuras marcadas con p115 (marcador de VTCs) son mayoritariamente móviles y describen trayectorias hacia y desde el complejo de Golgi (Stephens et al., 2000; Kirk and Ward, 2007). Resultan interesantes algunos antecedentes previos que indican que estructuras marcadas con Rab1b exhiben un comportamiento combinado entre COPII y p115. En concordancia con estos resultados, ensayos de inmunofluorescencias indican que Rab1b co-localiza con COPII y p115. Sin embargo, y debido a que los estudios de movilidad se han realizado de manera individual (empleando un solo marcador fluorescente), se desconoce si el comportamiento mixto que presentan las estructuras marcadas con Rab1b se corresponde a estructuras que co-localizan, durante un período determinado de tiempo, con COPII (marca de Rab1b estable/inmóvil) y/o con p115 (marca de Rab1b móvil).

Para analizar comparativamente la movilidad de Rab1b en relación a estructuras COPII y VTCs, se realizaron ensayos de “Time-lapse”, empleando simultáneamente 2 marcadores fluorescentes. Se co-transfectaron células HeLa con las construcciones Cherry-Rab1b y YFP-Sec24 o Cherry-Rab1b y GFP-p115 y luego de 24 horas se adquirieron paralelamente imágenes confocales de ambas marcas a intervalos de 4-6 segundos durante 6-10 minutos (ver Materiales y Métodos; Figura 11 y 12, A y B).

Los ensayos de “Time-lapse” indicaron, tal como fue descrito previamente (Stephens et al., 2000), que las estructuras marcadas con YFP-Sec24 son mayoritariamente inmóviles permaneciendo estables durante al menos 10 minutos, mientras que estructuras marcadas con Cherry-Rab1b presentan desplazamiento (móviles), en algunos casos con aparición y desvanecimiento (transientes), o permanecen inmóviles. Además, se observaron estructuras de tipo tubular marcadas con Rab1b que describen trayectorias variables (Video 1, marcas individuales). A partir del análisis de los ensayos de “Time-lapse” de doble marca se destacan 4 comportamientos, cuyas imágenes representativas se indican en la Figura 11 y Video 1 (superposición de marcas): 1) Estructura punteada marcada con Rab1b (B1, flecha) que se

mueve entre 2 estructuras estables marcadas con Sec24 (B1, asteriscos), co-localizando parcialmente con las mismas; 2) Formación de estructura tubular marcada con Rab1b (B2, flecha); 3) Estructura punteada marcada con Rab1b (B3, flecha) que se desplaza hacia el complejo de Golgi y en su trayectoria co-localiza con una estructura estable marcada con Sec24 (B3, asterisco); y 4) Estructura tubular marcada con Rab1b (B4, flecha) que describe una trayectoria desde un lugar a otro que pasa muy próxima a 3 estructuras COPII. En resumen, la mayoría de las estructuras de Rab1b, tienen gran movilidad y algunas de ellas se asocian a estructuras COPII durante su trayecto, mientras que un reducido número es relativamente estable y se asocian mayoritariamente a estructuras COPII. La asociación de estructuras Rab1b (móviles o inmóviles) a estructuras COPII se lleva a cabo de manera transitoria. Además, se observa aparición y/o desvanecimiento tanto de estructuras Rab1b (transientes) como de COPII de manera independiente una de la otra por lo que no sería necesaria la asociación entre ellas para que este comportamiento ocurra.

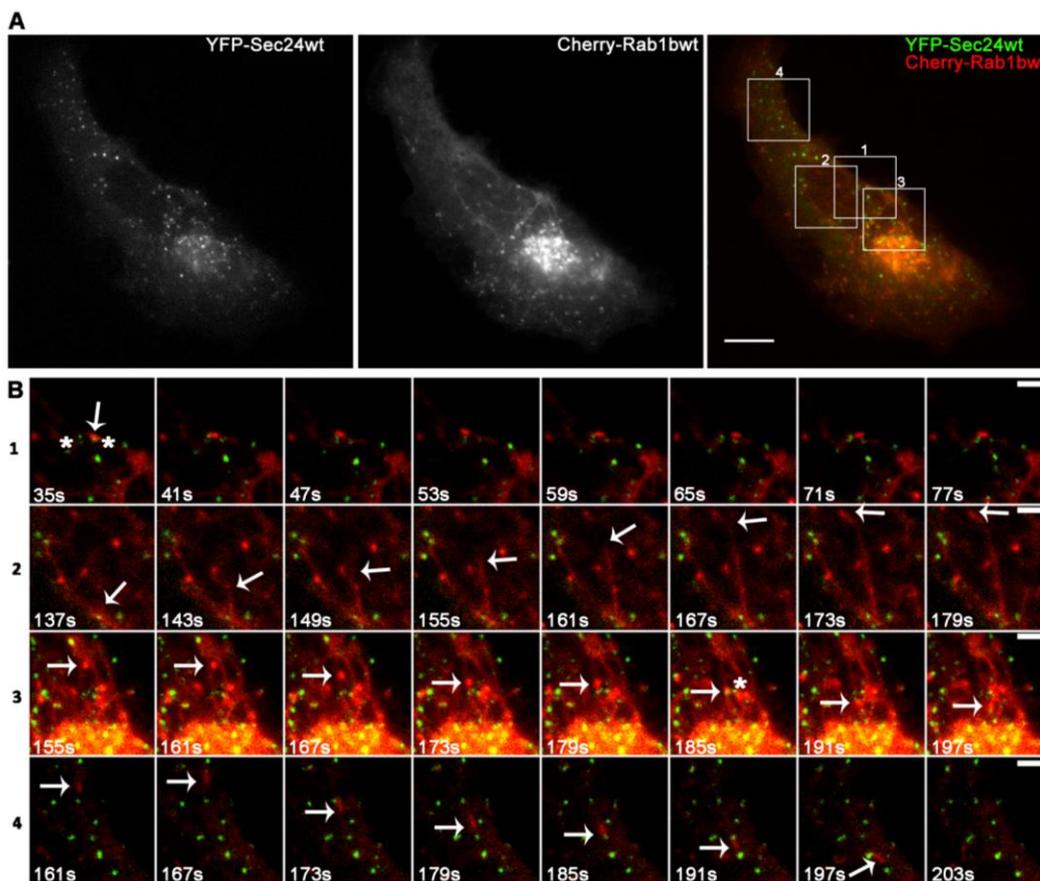


Figura 11: Time-lapse doble marca (COPII y Rab1b). Time-lapse representativo de células HeLa co-transfectadas con Cherry-Rab1bwt y YFP-Sec24wt. (A) Imágenes individuales (escala de grises) de Rab1bwt y Sec24wt y la correspondiente superposición de las mismas. (B 1-4) Ampliación de las diferentes regiones indicadas en los recuadros blancos mostrados en A. Las flechas indican la estructura de Rab1b que se destaca en cada recuadro amplificado a lo largo de los tiempos indicados, y los asteriscos señalan las estructuras COPII. Las barras de tamaño representan 10 μ m (A) y 3 μ m (B).

Ensayos de “Time-lapse” empleando los marcadores fluorescentes Cherry-Rab1b y GFP-p115, indican que las estructuras marcadas con GFP-p115 poseen una gran movilidad describiendo trayectorias desde y hacia el complejo de Golgi (Video 2, marcas individuales), tal como fue descrito para marcadores de VTCs (Bannykh and Balch, 1997; Kirk et al., 2007; Nelson et al., 1998). Además, se observan estructuras tubulares marcadas con p115 persistentes en el tiempo. A partir del análisis de los ensayos de doble marca se destacan 4 comportamientos diferentes (Figura 12 y Video 2, superposición de marcas): 1) Estructura donde Rab1b y p115 co-localizan (B1, flechas) y permanecen establemente asociadas a lo largo del tiempo total del video (más de 6 minutos). Además, se observan estructuras marcadas con p115 que no co-localizan con Rab1b (B1, asterisco); 2) Estructura punteada marcada con Rab1b que se desplaza de un lugar a otro (B2, flecha) y pasa muy próxima a una estructura p115 (B2, asterisco); 3) Estructura tubular marcada con p115 y Rab1b que se origina en el Golgi y se desplaza rápidamente hacia la periferia hasta que desaparece (B3, flecha); y 4) Estructura

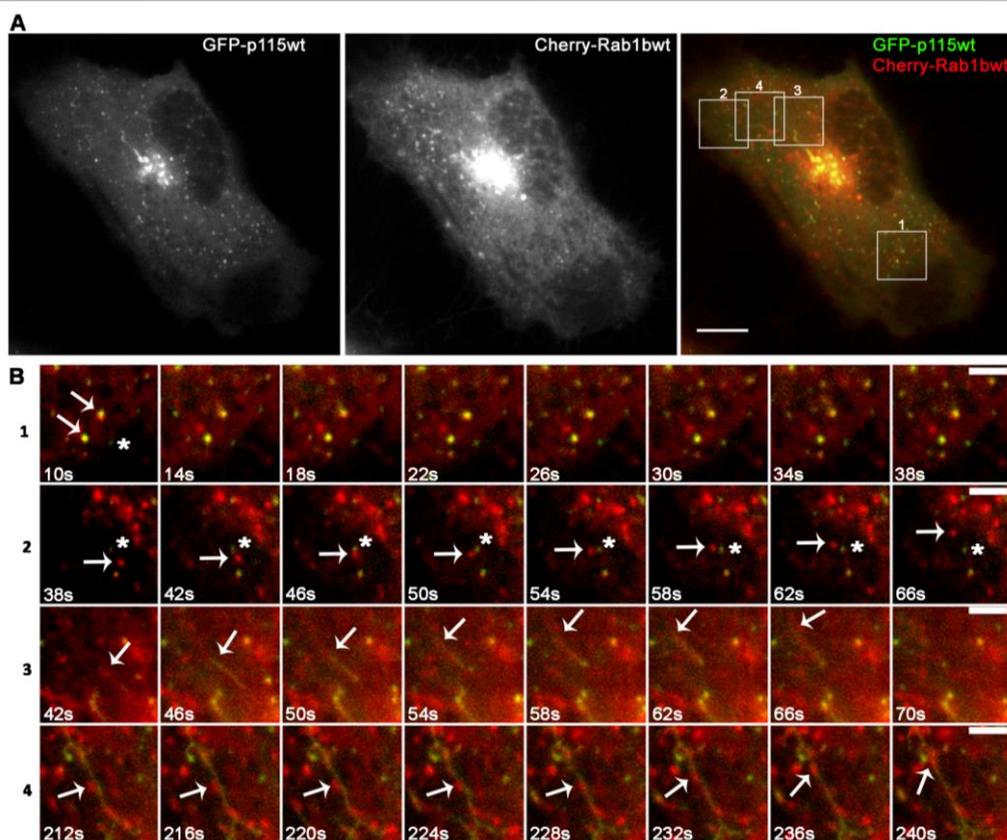


Figura 12: Time-lapse doble marca (p115 y Rab1b). Time-lapse representativo de células HeLa co-transfectadas con Cherry-Rab1bwt y GFP-p115wt. (A) Imágenes individuales (escala de grises) de Rab1b y p115 y la correspondiente superposición de las mismas. (B 1-4) Ampliación de las diferentes regiones indicadas en los recuadros blancos mostrados en A. Las flechas indican la estructura de Rab1b que se destaca en cada recuadro amplificado a lo largo de los tiempos indicados. El asterisco señala una estructura de p115. Las barras de tamaño representan 10 μm (A) y 3 μm (B).

tubular marcada con p115 que persiste durante más de 4 minutos. Se destaca la co-localización de un “foco” de Rab1b que se desplaza a lo largo de la misma (B4, flecha).

En resumen, la mayoría de las estructuras tubulares marcadas con Rab1b poseen también marca con p115. Sin embargo, existen estructuras tubulares de p115 sin la presencia de Rab1b. Curiosamente, en algunas estructuras tubulares marcadas con p115, la intensidad de la marca de Rab1b es variable a lo largo de los mismos, lo que implicaría la presencia de subdominios (o focos) de Rab1b en estas estructuras. Además, las estructuras punteadas marcadas con Rab1b (móviles o inmóviles) pueden asociarse, tanto de manera transitoria como estable, a estructuras punteadas marcadas con p115. Al igual que lo descrito entre Rab1b y Sec24, se observa aparición y/o desvanecimiento de estructuras marcadas con Rab1b (transientes) como de p115 de manera independiente una de la otra por lo que no sería necesaria la asociación entre ellas para que este comportamiento ocurra.

CONCLUSIONES

- Los ensayos de “Time-lapse” de doble marca confirman que, la dinámica heterogénea que presentan las estructuras marcadas con Rab1b se correlaciona con el comportamiento de las estructuras marcadas con COPII y p115. Asimismo, esta correlación es parcial, dado que no toda estructura inmóvil o móvil marcada con Rab1b co-localiza con una estructura de comportamiento homólogo marcada con COPII o p115, respectivamente.
- Las asociaciones de Rab1b con Sec24 y Rab1b con p115 son mayoritariamente transientes y sugieren que estas podrían ocurrir simultáneamente en espacios distintos del transporte RE-Golgi.

2. Cuantificación de la co-localización de Rab1b y efectores en diferentes condiciones de transporte

Con el objetivo de analizar cuantitativamente la distribución de Rab1b en relación a diferentes marcadores subcelulares de estructuras involucradas en transporte anterógrado de cargo, como ERES, VTCs y Golgi, se pusieron a punto cuantificaciones de inmunofluorescencias aplicando el coeficiente de correlación de Pearson (PCC, ver Materiales y Métodos). El PCC es un índice estadístico que mide la relación lineal entre 2 variables cuantitativas, y cuyos valores absolutos oscilan entre 0 (ausencia de correlación) y 1 (correlación perfecta). A diferencia de otros coeficientes, como el coeficiente de Mander’s (MOC), el PCC permite determinar la correlación de las señales (en este caso proteínas fluorescentes) provenientes de un mismo

pixel de la imagen sin tener en cuenta la intensidad de fluorescencia de cada proteína, lo que representa una gran ventaja cuando, por ejemplo, se quiere cuantificar co-localización de proteínas sobre-expresadas o se utilizan anticuerpos con diferente afinidad para cada proteína. Biológicamente, la correlación de las intensidades de las proteínas que co-localizan refleja una superposición de las mismas que puede implicar una interacción directa o indirecta (Zinchuk et al., 2007; Adler and Parmryd, 2010).

Además, se cuantificaron y compararon los PCC entre distintos marcadores en dos condiciones, en células en estado estacionario (situación control, donde hay equilibrio de transporte anterógrado y retrógrado) y en presencia de BFA, donde la salida del cargo está sincronizada en el RE.

2.1. Controles de cuantificación de co-localizaciones

En primer lugar se realizaron, empleando el PCC, controles de cuantificación analizando la co-localización de diferentes marcadores fluorescentes de proteínas de ubicación conocida. Como control positivo se emplearon 2 marcadores de COPII, Sec31 y Sec24, los cuales presentan una distribución en estructuras punteadas que no se altera con el uso de BFA (Ward et al., 2001; Garcia-Mata et al., 2003). Se transfectaron células HeLa de manera transiente con la construcción YFP-Sec24 (wt) y se analizaron células con niveles de expresión de YFP-Sec24 baja o media. El PCC entre Sec31 y Sec24 es superior a 0,8 ($0,84 \pm 0,03$) y no se modificó con el tratamiento con BFA (Figura 13, A y E). Como control negativo de las co-localizaciones se analizó el PCC entre COPII (Sec31) con un marcador de endosomas tempranos (EEA1), el cual también presenta una distribución en estructuras punteadas aún en presencia de BFA. En la condición control el PCC entre Sec31 y EEA1 fue bajo, aproximadamente 0,1 ($0,11 \pm 0,02$), y al igual que en el caso del control positivo, tampoco varía con el agregado de BFA (Figura 13, B y E).

En resumen, en estado estacionario se evidencia una fuerte correlación entre diferentes marcadores que forman parte del complejo COPII, que no se modifica por el tratamiento con BFA. Contrariamente, la correlación entre marcadores que forman parte de compartimientos distintos (ERES y endosomas) es débil, y tampoco se modifica con el agregado de BFA. Por lo tanto, estos resultados indican, que el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) es un índice aceptable para determinar cuantitativamente co-localización entre diferentes proteínas en las condiciones empleadas.

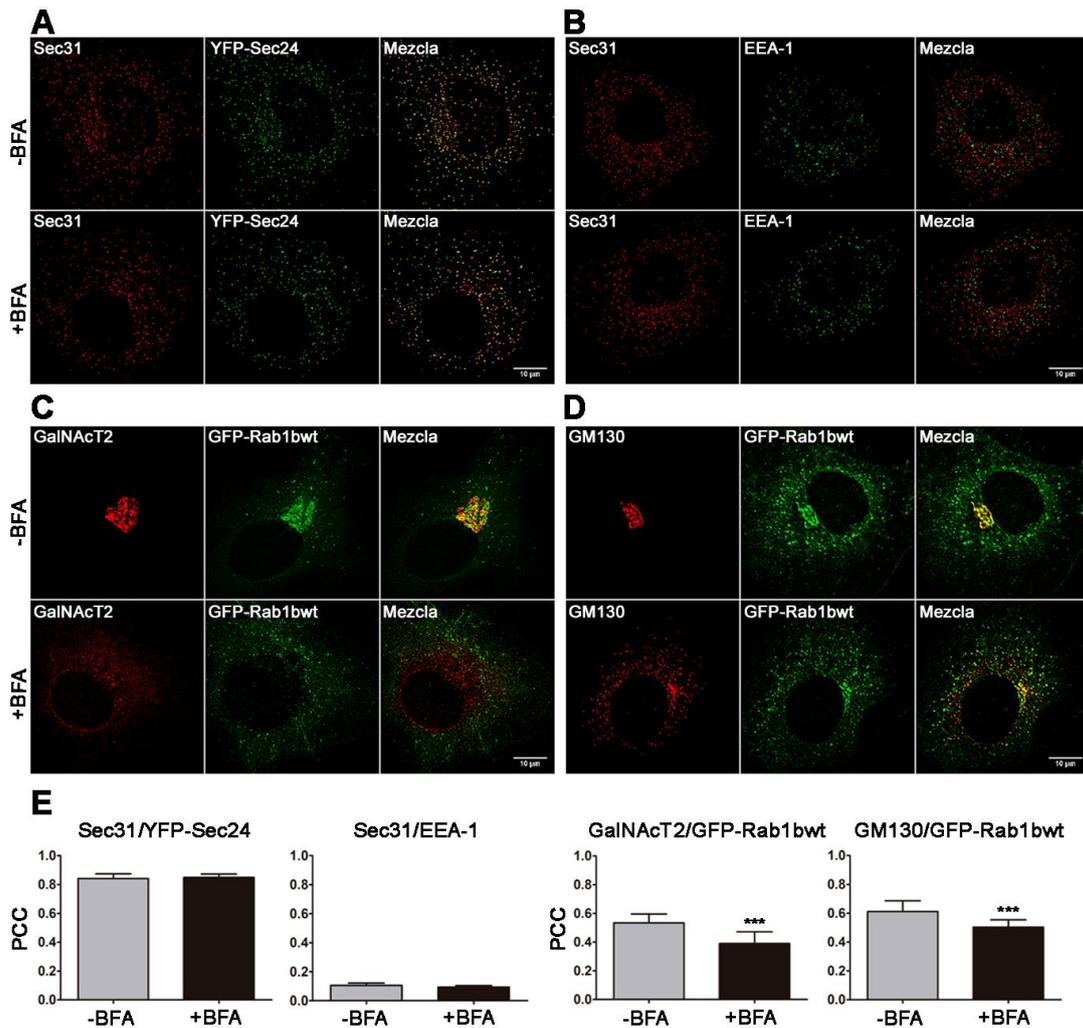


Figura 13: Controles de co-localización y redistribución de Rab1b. Cuantificación de la co-localización de estructuras punteadas empleando el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) en células tratadas o no con BFA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BFA durante 2 horas). (A) Control positivo: Co-localización de dos marcadores de COPII, Sec31 y Sec24 (YFP-Sec24wt). (B) Control negativo: Co-localización de COPII (Sec31) con un marcador de endosomas tempranos (EEA1). (C) Co-localización de GalNAcT2 y GFP-Rab1bwt. (D) Co-localización de GM130 y GFP-Rab1bwt. (E) Gráfico de barras que representa el PCC de co-localización entre los marcadores indicados (8-12 células por condición, n=2-3 experimentos independientes). Los datos se expresan como la media \pm DE. Las barras de tamaño representan 10 μm .

2.2. Co-localización de Rab1b con diferentes compartimientos

Rab1b participa del transporte desde el Retículo Endoplásmico (RE) al Golgi, interactuando (unida a GTP) con proteínas localizadas en ERES (componentes COPII), VTCs (p115), y complejo de Golgi (GM130). En concordancia con su función, Rab1b co-localiza parcialmente con todas ellas, sin embargo se desconoce el valor cuantitativo de estas co-localizaciones cuando existe un equilibrio de transporte anterógrado y retrógrado, y cómo estas se modifican al sincronizar el transporte mediante el uso de BFA. Teniendo en cuenta que Rab1b es necesaria para la concentración del cargo en ERES (Slavin et al., 2011), y que BFA no altera la distribución de

COPII, ni la estructura de los ERES (Orci et al., 1993; Lippincott-Schwartz et al., 2000), nosotros postulamos que BFA induciría redistribución de Rab1b fundamentalmente en ERES.

Para analizar nuestra hipótesis, se evaluó cuantitativamente, empleando el PCC, la co-localización de Rab1b con proteínas marcadoras de ERES, VTCs y complejo de Golgi. Así, se determinó el PCC entre GalNAcT2 y GFP-Rab1b, y GM130 y GFP-Rab1b. GalNAcT2 se localiza en el cis/trans Golgi mientras que GM130 en el cis-Golgi (Nakamura et al., 1995). Además, Rab1b se localiza principalmente en el cis-Golgi y en estructuras punteadas correspondientes a su localización en ERES y VTCs. En concordancia con estas diferentes distribuciones, el coeficiente de correlación de Pearson entre Rab1b y GalNAcT2 es de $0.53 \pm 0,06$, mientras que el PCC entre Rab1b y GM130 es de $0,61 \pm 0,07$ (Figura 13, E). Este valor es levemente mayor que el PCC entre GalNAcT2 y GFP-Rab1b posiblemente porque ambas, GM130 y Rab1b, se localizan principalmente en el cis-Golgi.

El tratamiento con BFA induce la redistribución de GalNAcT2 al RE y, en concordancia, exhibe un patrón reticular (Figura 13, C +BFA), lo que coincide con lo reportado previamente (Miles et al., 2001). Además, Rab1b se redistribuye en estructuras punteadas, similar a GM130 (Figura 13, D +BFA). En presencia de BFA la co-localización de GalNAcT2/Rab1b y GM130/Rab1b disminuye leve, pero significativamente, respecto a la situación control sin BFA (Figura 13, E). Estos resultados sugieren que las estructuras punteadas marcadas con Rab1b se localizan próximas al RE (posiblemente en ERES), y que parcialmente co-localizan con GM130.

¿A qué se corresponden las estructuras punteadas a las cuales se distribuye Rab1b en respuesta a BFA? Es posible que, como Rab1b interacciona con estructuras COPII en los ERES, y posteriormente induce la asociación de COPI en los VTCs (Monetta et al., 2007; Slavin et al., 2011), la sincronización del transporte (inducida por +BFA) promueva una modificación en la distribución de Rab1b mayoritariamente en los ERES y/o VTCs. Para evaluar esta hipótesis, se comparó la co-localización de Rab1b con diferentes marcadores de ERES y VTCs en ausencia y en presencia de BFA (Figura 14). Se emplearon 2 marcadores de VTCs, ERGIC53 y p115 (Nelson et al., 1998; Hauri et al., 2000). P115 también es marcador de cis-Golgi y además efector de Rab1b. GFP-Rab1bwt y ERGIC53 presentan distribuciones similares, con concentración en la región juxtenuclear y distribución en estructuras punteadas. En presencia de BFA, ambas proteínas se distribuyen completamente a estructuras punteadas, el punteado de Cherry-Rab1b se distribuye más hacia la periferia celular y exhibe un mínimo patrón reticular. La co-localización de Rab1b y ERGIC53 ($PCC=0.39 \pm 0,08$), no varía con el agregado de BFA. Similarmente, la co-localización GFP-p115wt y Cherry-Rab1bwt (Figura 14, B y E) en ausencia

de BFA ($PCC=0.60 \pm 0,06$) no se modifica en respuesta a la misma. La co-localización entre Rab1b y p115 es mayor que entre Rab1b y ERGIC. Esto coincide con lo previamente descrito para p115, que indica que la misma se localiza en VTCs y cis-Golgi (al igual que Rab1b; Nelson et al., 1998), mientras que ERGIC53, es considerado el marcador más exclusivo de los VTCs (Hauri et al., 2000), y si bien presenta algo de marca juxtenuclear del Golgi, ERGIC no se superpone totalmente con la marca de Rab1b en esa región.

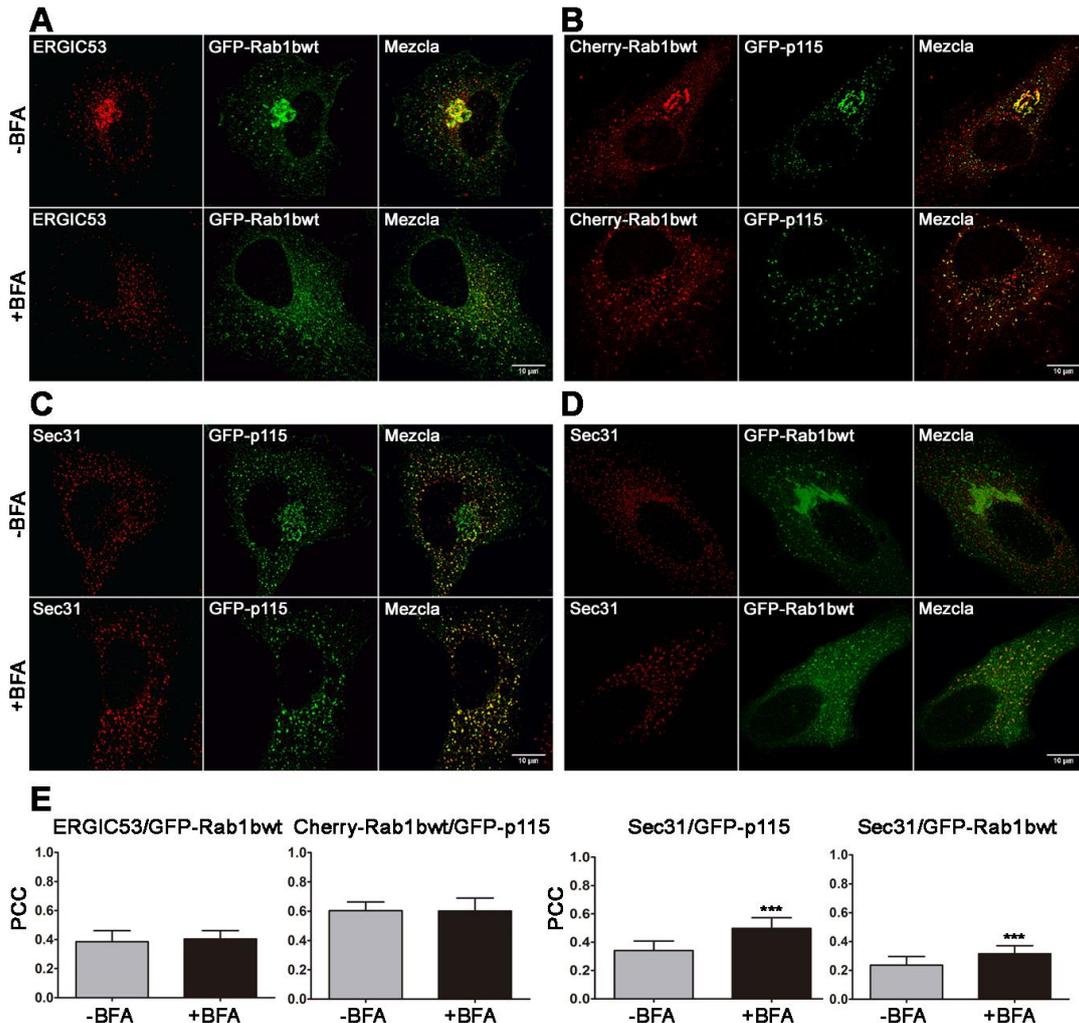


Figura 14: Co-localización de Rab1b y marcadores de ERES y VTCs. Cuantificación de la co-localización entre diferentes marcadores en células control (-BFA) o con BFA (+BFA, 5 μ g/ml de BFA durante 2 horas). (A) ERGIC53 y GFP-Rab1bwt. (B) Cherry-Rab1bwt y GFP-p115wt (VTCs). (C) Sec31 (COPII) y GFP-p115wt. (D) Sec31 y GFP-Rab1bwt. (E) Gráfico de barras que representa el PCC de co-localización entre los marcadores indicados (8-12 células por condición, n=2-3 experimentos independientes). Los datos se expresan como la media \pm DE. Las barras de tamaño representan 10 μ m.

Teniendo en cuenta que Rab1b y p115 ejercen parte de sus funciones en ERES (Allan et al., 2000), es posible que la acumulación o sincronización de salida de cargo, inducida por BFA, incremente la co-localización de ambas en ERES. Para evaluar esta opción, se analizó la co-

localización de p115 con Sec31 (marcador de ERES), y Rab1b con Sec31 (Figura 14, C y D). En ambos casos la co-localización entre estas proteínas aumenta levemente en respuesta a BFA (Figura 14, E).

CONCLUSIONES

- En estado estacionario, la co-localización de Rab1b en ERES (COPII) y VTCs (ERGIC53 y p115) es parcial. Asimismo el grado de co-localización es mayor en VTCs.
- La co-localización de Rab1b en ERES y de p115 en ERES incrementa levemente en respuesta a BFA, indicando que la distribución espacial de Rab1b y p115 en ERES es levemente modificada ante la alteración del equilibrio del transporte. Estos resultados sugieren la existencia de una subpoblación de estructuras ERES que interactuaría con Rab1b o p115.

3. Estudio del tiempo de localización de Rab1b en estructuras COPII, y la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las mismas en diferentes condiciones de transporte

3.1. Análisis del tiempo de asociación de Rab1b con ERES

El leve incremento de co-localización de Rab1b en ERES en respuesta a BFA sugiere que cuando todo cargo está localizado en el RE la redistribución de Rab1b en ERES es baja. Es probable que, en presencia de BFA, en vez de modificarse la cantidad de Rab1b que se distribuye a los ERES, se modifique el tiempo que Rab1b permanece junto a estas estructuras. Para analizar esta posibilidad se cuantificó el tiempo de co-localización de Rab1b con Sec24. Se co-transfectó con Cherry-Rab1b y YFP-Sec24 (wt), y se realizaron ensayos de "Time-lapse". Se adquirieron imágenes cada 4-6 segundos en ambos colores durante un tiempo total de 6-10 minutos, y se cuantificó el tiempo de asociación (o co-localización) de Rab1b a las estructuras COPII comparativamente en células en estado estacionario y tratadas con BFA. Para ello se seleccionaron al azar estructuras (entre 40 y 50 en cada condición) de distintas células que tenían doble marca en la primera imagen (tiempo 0s), y se determinó el tiempo que permanecen asociadas las 2 proteínas en ambas condiciones (Figura 15, A y B; y Video 3, -BFA y +BFA). Los resultados indican que el tiempo de co-localización de Rab1b en ERES incrementa aproximadamente 4 veces (mediana de 150 a 570 segundos) en presencia de BFA (Figura 15, C).

Rab1b recluta a GBF1 la cual participa en el intercambio de Arf1-GDP por GTP permitiendo el reclutamiento de COPI. BFA inhibe la actividad de GBF1 y por ello induce disociación de Arf1 de membranas impidiendo el reclutamiento de COPI en la interfase de los ERES-VTCs (García-Mata et al., 2003). BFA forma un complejo ternario con GBF1 y Arf1-GDP, impidiendo el desplazamiento de GDP en Arf1. Además, GBF1 se relocaliza en el RE donde permanece establemente asociada. Considerando lo anteriormente planteado, es posible que el aumento del tiempo de asociación de Rab1b en ERES causada por BFA (Peyroche et al., 1999) sea debido a la incapacidad de Rab1b de interaccionar/reclutar con GBF1 dado que la misma se encuentra establemente asociada a las membranas del RE (Szul et al., 2007). Sin embargo, no se puede descartar que el efecto sea por la acción de BFA sobre otros sustratos, como BARS (De Matteis et al., 1999). Para confirmar que el efecto observado es específico sobre GBF1, se analizó el tiempo de co-localización entre Rab1b y COPII en células que expresan la mutante dominante negativa de GBF1, E794K. Esta mutante posee alterado el sitio catalítico Sec7 y pierde la actividad intercambiadora de nucleótido de las Arf GEF (Szul et al., 2005). E794K produce el arresto del transporte en VTCs tempranos que están adyacentes a los ERES impidiendo la maduración de los mismos ya que inhibe el reclutamiento de COPI (García-Mata et al., 2003). La expresión de E794K induce un fenotipo distintivo, donde al igual que el tratamiento con BFA, el complejo de Golgi se distribuye al ER, Rab1b se redistribuye totalmente a estructuras estructuras punteadas (no hay marca juxtaneuclear dado a la reabsorción del complejo de Golgi) y tampoco induce cambio en ERES. Se realizaron ensayos de “Time-lapse” similares a los previamente descritos, co-transfectando con Cherry-Rab1bwt, YFP-Sec24wt y E794K-myc. Previo a realizar los ensayos de “Time-lapse” se confirmó la eficiencia de la triple transfección realizando ensayos de inmunofluorescencia. Además, se observó el fenotipo de Rab1b en células transfectadas con E794K-myc, evidenciando una distribución en estructuras punteadas similar a la condición tratada con BFA. El fenotipo de Rab1b que se manifiesta en estas células nos permitió seleccionarlas, dado que en ensayos de “Time-lapse” no es posible observar aquellas células transfectadas con la mutante E794K.

Se determinó que, en células transfectadas con E794K-myc, el tiempo de asociación de Rab1b a ERES es mayor que en la condición control y similar comportamiento al observado en células tratadas con BFA (Figura 15 y Video 3, GBF1-E794K). Estos resultados sugieren que el tiempo de permanencia de Rab1b en estructuras COPII es dependiente del reclutamiento y/o actividad de GBF1 y del reclutamiento de COPI en la interfase de ERES-VTCs.

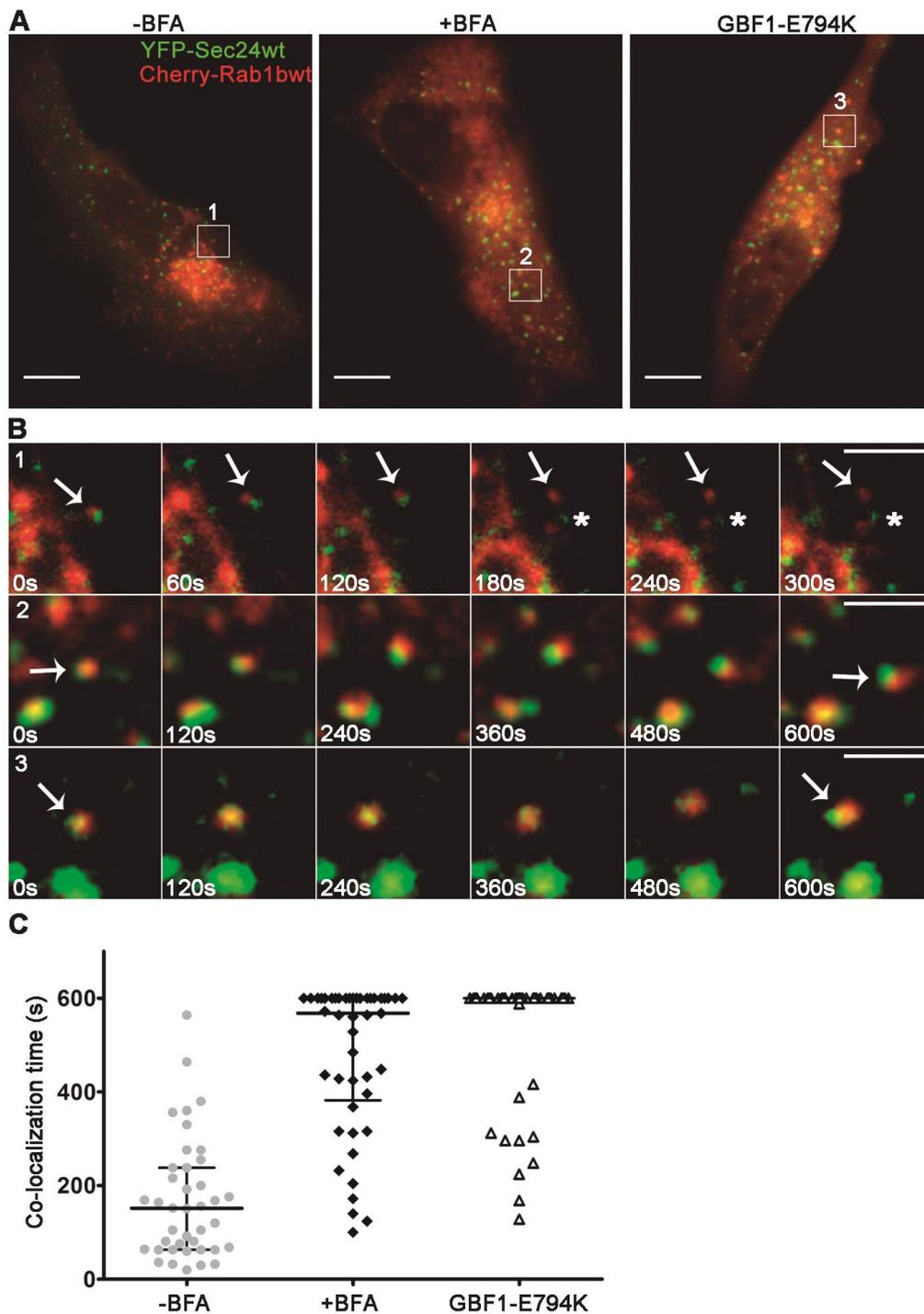


Figura 15: Tiempo de co-localización de estructuras marcadas con Rab1b y COPII. “Time-lapse” en células HeLa co-transfectadas con Cherry-Rab1bwt y YFP-Sec24wt. (A) Imagen representativa de una superposición de Rab1bwt y Sec24wt en 3 condiciones distintas: control (-BFA), tratadas con BFA (+BFA, 5 μ g/ml de BFA durante 2 horas), y transfectadas con GBF1-E794K-myc. (B 1-4) Ampliación de las diferentes regiones indicadas en los recuadros blancos mostrados en A. Las flechas señalan las estructuras punteadas que co-localizan, y el asterisco indica una estructura COPII que deja de co-localizar con Rab1b. (C) Gráfico de dispersión o “scatter plot” que representa el tiempo de co-localización de cada estructura analizada. Se analizaron 40 estructuras (-BFA); 45 estructuras (+BFA); y 51 estructuras (GBF1-E794K) de n=3 células por cada condición. Los datos se expresan como la mediana con el rango intercuartil (25-75%). Las barras de tamaño representan 10 μ m (A) y 3 μ m (B).

3.2. Dinámica de asociación/disociación de Rab1b a membranas de ERES

Como se mencionó anteriormente, Rab1b es una proteína periférica de membrana que cicla constantemente del citosol (unida a GDP) a membranas (unida a GTP). Ensayos de FRAP de la dinámica de asociación/disociación de Rab1b al complejo de Golgi, sugieren que Rab1b se asocia mayoritariamente al mismo mediante el reclutamiento directo de moléculas de Rab1b disponibles en el pool citosólico, en forma independiente del transporte de intermediarios mediado por microtúbulos (Monetta et al., 2007). Debido a la alta movilidad y transitoriedad de las estructuras punteadas marcadas con Rab1b (Figuras 11 y 12, y videos 1 y 2; Monetta et al., 2007), no se han reportado ensayos de FRAP de las mismas hasta el momento.

El aumento del tiempo de permanencia de Rab1b en estructuras COPII en presencia de BFA, podría ser consecuencia de una modificación en la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las mismas. Alternativamente, esta dinámica podría no modificarse y ante el bloqueo de transporte anterógrado y falta de nueva formación y maduración de VTCs, Rab1b permanecería siempre asociándose/disociándose en las mismas estructuras.

Para determinar esta posibilidad se realizaron ensayos de FRAP de Rab1b en células transfectadas con Cherry-Rab1bwt y YFP-Sec24wt, y luego tratadas con BFA (Figura 16). Concretamente se foto-blanqueó la marca de Cherry-Rab1b en estructuras que co-localizan con YFP-Sec24wt, para garantizar que las estructuras corresponden a ERES/COPII, y luego se analizó la recuperación de la fluorescencia de Cherry-Rab1b en esas estructuras (ver Materiales y Métodos, Figura 16). La fluorescencia de Rab1b se recupera totalmente durante el transcurso del tiempo del ensayo (Figura 16 B, panel inferior), mientras que YFP-Sec24 permanece hasta el final del ensayo (Figura 16 B, panel superior), lo que confirma que la recuperación de la fluorescencia de Rab1b ocurre específicamente en esa estructura COPII. Aproximadamente en 120 segundos se recupera el ~90% de la fluorescencia inicial de Cherry-Rab1b en ERES, y el $t_{1/2}$ de la recuperación de la fluorescencia es de ~20 segundos (Figura 16, C).

La gran movilidad y transitoriedad de las estructuras punteadas marcadas con Rab1b impide técnicamente realizar ensayos de FRAP en células control sin BFA. Debido a esto, se utilizó como control el tratamiento con Nocodazol (NOC). NOC promueve la desorganización de microtúbulos llevando a la re-localización de las proteínas del Golgi hacia estructuras periféricas conocidas como Golgi mini-stacks (Storrie et al., 1998; Ward et al., 2001). En esta condición, se reduce la movilidad de los VTCs y se puede realizar FRAP de marcadores de estas estructuras en circunstancias donde hay reclutamiento de GBF1 en VTCs, sorting de cargo,

reclutamiento de COPI y transporte anterógrado y retrógrado. Así, la dinámica y el $t_{1/2}$ de recuperación de Cherry-Rab1b en estructuras punteadas en presencia de BFA son semejantes a los determinados en células incubadas en presencia de Nocodazol (control, Figura 16, C).

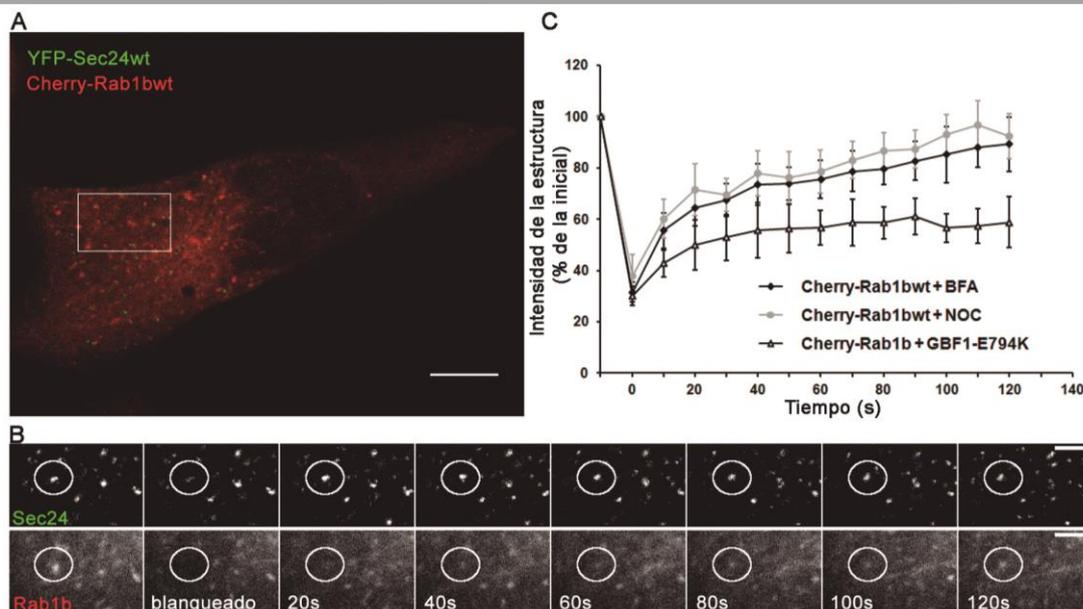


Figura 16: Cinética de asociación/disociación de Rab1b a membranas de ERES. (A) Imagen representativa de co-transfección con Cherry-Rab1bwt y YFP-Sec24wt en presencia de BFA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BFA durante 2 horas). El recuadro blanco indica la zona elegida para realizar el FRAP. (B) Ensayo de FRAP representativo donde se muestran las imágenes individuales de Rab1b y Sec24 (escala de grises) de una estructura contenida en el recuadro blanco seleccionado en A. La secuencia de imágenes muestra la estructura seleccionada para el foto-blanqueado a diferentes tiempos del mismo: antes, inmediatamente después y durante la recuperación de la fluorescencia a los tiempos indicados. (C) Cuantificación de la intensidad de Rab1b en ERES en células que co-expresan Cherry-Rab1bwt y YFP-Sec24wt tratadas con BFA (\blacklozenge ; n=8 estructuras), con NOC (\circ ; n=5 estructuras), o que además expresan la mutante negativa GBF1-E794K (\triangle ; n=8 estructuras). Las barras de error representan le DE. Las barras de tamaño representan 10 μm (A) y 3 μm (B).

Los ensayos de FRAP también se realizaron, al igual que los “Time-lapse” anteriores, en presencia de la dominante negativa de GBF1, E794K.

Se co-transfectaron células HeLa con Cherry-Rab1b, YFP-Sec24wt y E794K-myc, y se determinó el tiempo de recuperación de la fluorescencia de Cherry-Rab1b en estructuras que co-localizan con YFP-Sec24wt y en células que presentan el fenotipo típico de la expresión de E794K, es decir, en células donde la marca de Cherry-Rab1b es totalmente punteada, sin concentración en la zona juxtanclear. De manera interesante, Cherry-Rab1b recupera, en ERES, menos del 60% de la intensidad de fluorescencia inicial en contraste con el $\sim 90\%$ en células control o tratadas con BFA Figura 16 C, lo que indica un incremento de la fracción inmóvil de Rab1b. De manera similar, se ha demostrado que E794K posee menor movilidad que GBF1 wt, esta disminución está relacionada a la pérdida de la actividad catalítica de E794K y a la formación

de un complejo estable con Arf-GDP. Estos resultados sugieren que una vez que Rab1b interacciona con la mutante E794K, necesita que esta se disocie para su posterior disociación de los ERES.

CONCLUSIONES

- El tiempo de permanencia de Rab1b en estructuras COPII es dependiente del reclutamiento y/o actividad de GBF1 y del reclutamiento de COPI en la interfase de ERES-VTCs.
- Además, los ensayos de FRAP sugieren que una vez que Rab1b interacciona con GBF1 necesita que esta se disocie para su posterior separación de la membrana de los ERES

4. Evaluación de la relación espacio-temporal de la asociación de Rab1b con estructuras COPII durante el transporte anterógrado de cargo

Resultados previos indican que en presencia de BFA la co-localización entre Rab1b y COPII es parcial sugiriendo que Rab1b actuaría en una subpoblación de estructuras COPII (Figura 14). Otra alternativa podría ser que Rab1b interacciona con todas las estructuras COPII pero no simultáneamente sino en distintos momentos durante el transcurso del tiempo.

Con el objetivo de evaluar esta posibilidad, se analizó si la población de estructuras COPII se asocia a Rab1b durante el transporte anterógrado de cargo. Para ello, se realizó, en células tratadas con BFA (1 $\mu\text{g/ml}$, 30 minutos), el lavado de la misma que permite restablecer el transporte anterógrado. Como se mencionó anteriormente, se considera que en los períodos iniciales del lavado de BFA (~30-40 min) hay prácticamente sólo transporte anterógrado y las proteínas del Golgi (consideradas también cargo) se concentran en ERES de manera dependiente de Rab1b (Slavin et al., 2011). En estas condiciones se analizó la interacción de estructuras COPII con Rab1b durante el transcurso inicial del lavado de BFA. Para ello, se co-transfectaron células con Cherry-Rab1b, YFP-Sec24 y SialT2-CFP y al día siguiente se trataron con BFA (1 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos). La BFA se lavó cambiando el medio y, luego de 10 minutos de lavado, se realizaron ensayos de “Time-lapse”, capturando los 3 fluoróforos simultáneamente, a intervalos de 30 segundos durante 30 minutos. Posteriormente se analizaron los “Time-lapse” de aproximadamente 50 estructuras marcadas con YFP-Sec24, que permanecieron estables por más de 8 minutos en el video, y se definió si en cada una de ellas se observaba la asociación de Cherry-Rab1b en un tiempo durante la captura de imágenes.

Una representación del análisis realizado a las estructuras se muestra en la Figura 17 B y Video 4 (doble marca de la región seleccionada), donde se observaron 5 estructuras YFP-Sec24 (marcados por asteriscos numerados del 1 al 5, panel de YFP-Sec24), las cuales permanecen estables a lo largo de 12 minutos (del minuto 12 al 24 del lavado). En cada estructura

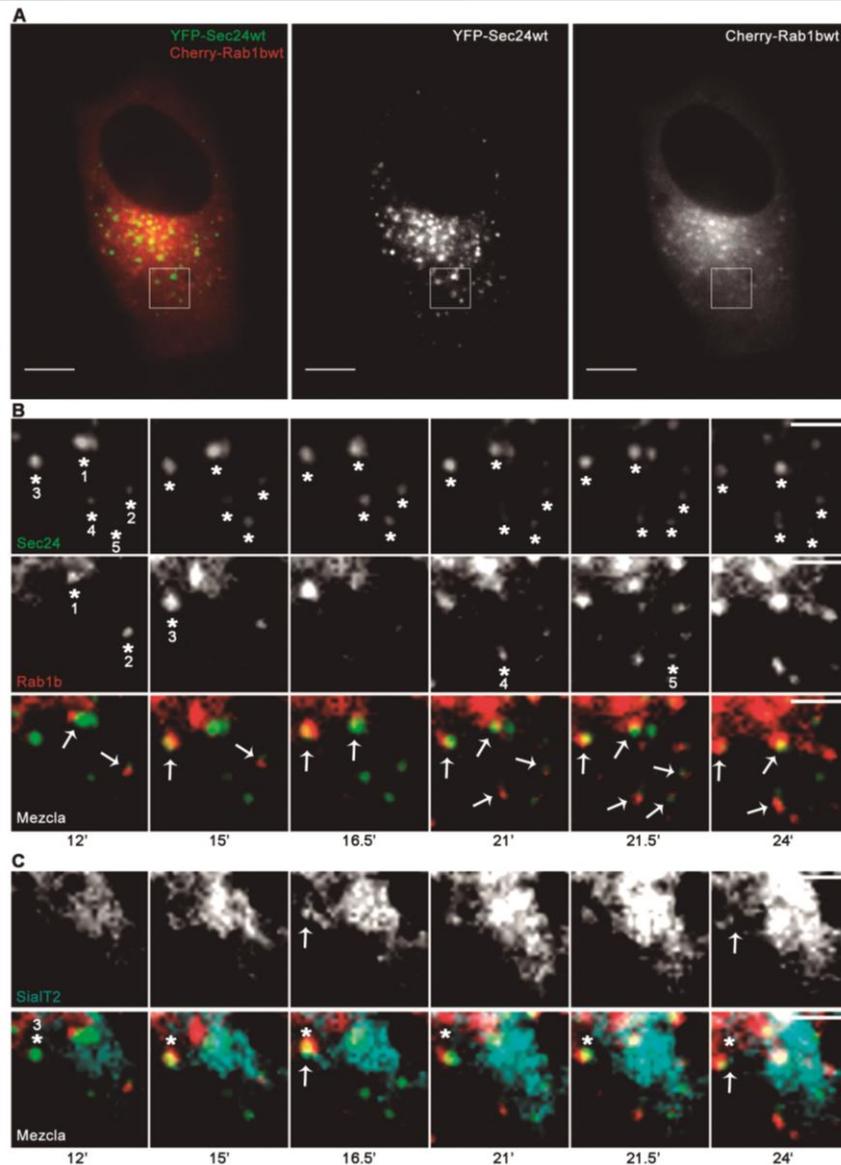


Figura 17: Time-lapse triple marca (COPII, Rab1b y SialT2) durante el lavado de BFA. Células HeLa se co-transfectaron con Cherry-Rab1bwt, YFP-Sec24wt y SialT2-CFP. Las células se incubaron con BFA (1μg/ml durante 2 horas), y se realizaron los “Time-lapse” luego del lavado de BFA, mediante recambio de medio. (A) Imagen representativa de una célula transfectada y sus correspondientes imágenes individuales de Cherry-Rab1bwt y YFP-Sec24wt (escala de grises). El recuadro blanco indica el área seleccionada que se amplifica en B y C. (B) Imágenes individuales de Cherry-Rab1bwt, YFP-Sec24wt y sus correspondientes superposiciones (Mezcla) de los tiempos indicados del lavado de BFA. Los asteriscos en el panel de Sec24 señalan las estructuras analizadas, mientras que en el panel de Rab1b indican la aparición de la misma en los distintos tiempos del lavado de BFA. En el panel Mezcla las flechas indican las estructuras COPII que están asociadas a Rab1b. La barra de tamaño representa 3 μm. (C) Imágenes individuales de SialT2-CFP y la superposición de la triple marcación. Las flechas muestran la aparición de SialT2 en una estructura COPII (asterisco) asociada a Rab1b. Las barras de tamaño representan 10 μm (A) y 3 μm (B y C).

YFP-Sec24 se puede observar la aparición de la marca de Cherry-Rab1b a diferentes tiempos (asteriscos, panel Rab1b), es decir que en el primer tiempo indicado (12 minutos), 2 de las 5 estructuras YFP-Sec24 (1 y 2) evidencian la aparición de Cherry-Rab1b, en el minuto 15 se visualiza Cherry-Rab1b en la tercera estructura YFP-Sec24, mientras que en las estructuras 4 y 5 aparece Rab1b a los 21 y 21.5 minutos respectivamente. En la superposición de ambas marcas se muestra la co-localización de Rab1b con las distintas estructuras COPII analizadas a lo largo de los tiempos indicados (flechas, panel Mezcla). Los ensayos de “Time-lapse” indican que la totalidad de las estructuras COPII analizadas (50) se asocian a Rab1b en algún momento del lavado. Estos resultados sugieren que durante el transporte anterógrado de cargo, las estructuras estables de COPII se asocian a Rab1b en distintos momentos, poniendo en debate así la presencia de subpoblaciones de COPII.

Para analizar la asociación de Rab1b a estructuras COPII en relación a la salida del cargo, se observó también el comportamiento de SialT2-CFP en las mismas estructuras COPII donde previamente se estudió Rab1b. SialT2 es una enzima del complejo de Golgi que se redistribuye al RE en respuesta a BFA presentando un patrón reticular (Figura 17 C, panel de SialT2-CFP, tiempo 12 minutos). Durante el lavado de BFA de SialT2 se comienza a concentrar en los ERES (Figura 17 C, panel de SialT2-CFP, tiempo 16.5 minutos) previo a su salida al Golgi. A medida que transcurre el lavado de BFA aparecen focos de concentración de SialT2 (flechas, panel de SialT2-CFP, tiempos 16.5 y 24 minutos), que también co-localizan con YFP-Sec24 y Cherry-Rab1b (flechas, panel Mezcla, tiempos 16.5 y 24 minutos). Si bien la gran mayoría de las estructuras COPII se asocian en algún momento a Rab1b, es interesante el hallazgo de que no todas evidencian también una concentración de SialT2. Por ejemplo en la Figura 7, donde se indican 5 estructuras marcadas con YFP-Sec24 que co-localizan con Rab1b, durante el transcurso del tiempo analizado, sólo una (asterisco número 3) co-localiza con SialT2 en ese mismo período (Figura 17 C y Video 4, triple marca de la región seleccionada). Se destaca que, no se observan focos de concentración de SialT2 cuando no se asocia Rab1b a las estructuras COPII. En conjunto, estos resultados indican que la presencia de Rab1b es necesaria para que tenga lugar el “sorting” o la concentración del cargo (SialT2), y posiblemente las estructuras COPII asociadas a Rab1b que no concentran SialT2 estén involucradas en el “sorting” de otras proteínas cargo no observadas. Por último, es importante mencionar que a tiempos largos del lavado de BFA (más de 120 minutos), SialT2 pierde el patrón reticular y se distribuye principalmente en el complejo de Golgi (dato no mostrado).

Los resultados presentados anteriormente, sugieren que Rab1b y SialT2 se concentran casi al mismo tiempo en estructuras COPII. Con el fin de analizar precisamente la relación temporal

entre la aparición de un foco de Rab1b y del cargo analizado (SialT2) en estructuras COPII, se cuantificaron la concentración de Rab1b y SialT2 a diferentes tiempos (Figura 19). La estrategia utilizada para cuantificar consiste en analizar, paralelamente, la varianza de la intensidad de fluorescencia de pixeles (IFP) correspondientes a la marca de Rab1b y SialT2 en una determinada marcada con Sec24 a lo largo del tiempo del ensayo. Para cuantificar la concentración de Rab1b y/o SialT2 se analizó cómo se modifican los valores de varianza (cuadrado de la desviación estándar, DE) de la intensidad promedio de fluorescencia de una señal fluorescente en un área determinada, tal como se realizó en el trabajo de Dukhovny y colaboradores al analizar la concentración de VSV-G durante el cambio a la temperatura permisiva que permite su salida del RE hacia el Golgi (Dukhovny et al., 2008; Figura 18, A y B). Así, VSV-G que presenta un patrón reticular cuando está distribuida en el RE, se concentra en estructuras punteadas a medida que se exporta y esto matemáticamente implica un aumento de la intensidad de fluorescencia de los pixeles donde se está concentrando VSV-G (estructuras punteadas, ERES) en detrimento de la intensidad de fluorescencia de los pixeles del área que circunda a cada estructura (RE). Si se analiza la distribución de VSV-G en un área determinada se observa que no hay cambios de la intensidad media (Figura 18, B y C), dado que la cantidad de moléculas totales es la misma, sin embargo, la varianza de la determinación se modifica, incrementándose, como consecuencia de la concentración de VSV-G en estructuras definidas. Empleando esta estrategia de la medición de la varianza de la intensidad de fluorescencia de los pixeles, se realizaron cuantificaciones de la concentración de Rab1b y SialT2 en cada una de las estructuras COPII analizadas previamente (50 estructuras estables por más de 8 minutos) durante el lavado de BFA. Específicamente, se tomó un área que incluye una estructura COPII y se cuantificó la varianza de la IFP de Cherry-Rab1b o SialT2-CFP durante el lavado de BFA, relativizando este valor a la varianza obtenida al tiempo cero de lavado para cada proteína. Teniendo en cuenta que se utilizó microscopía confocal, se normalizó también la varianza relativa tanto de Rab1b como de SialT2, con la intensidad de fluorescencia media relativa de COPII, para independizar la cuantificación de la concentración o desaparición de Rab1b en estructuras COPII que se mueven de plano. La varianza relativa, tanto de Rab1b como de SialT2, permite analizar la concentración o desaparición de las mismas en una estructura COPII, mientras que la intensidad de fluorescencia media relativa de COPII se utilizó como referencia ya que es en esta estructura estable donde ocurre la concentración o desaparición de Rab1b y de SialT2.

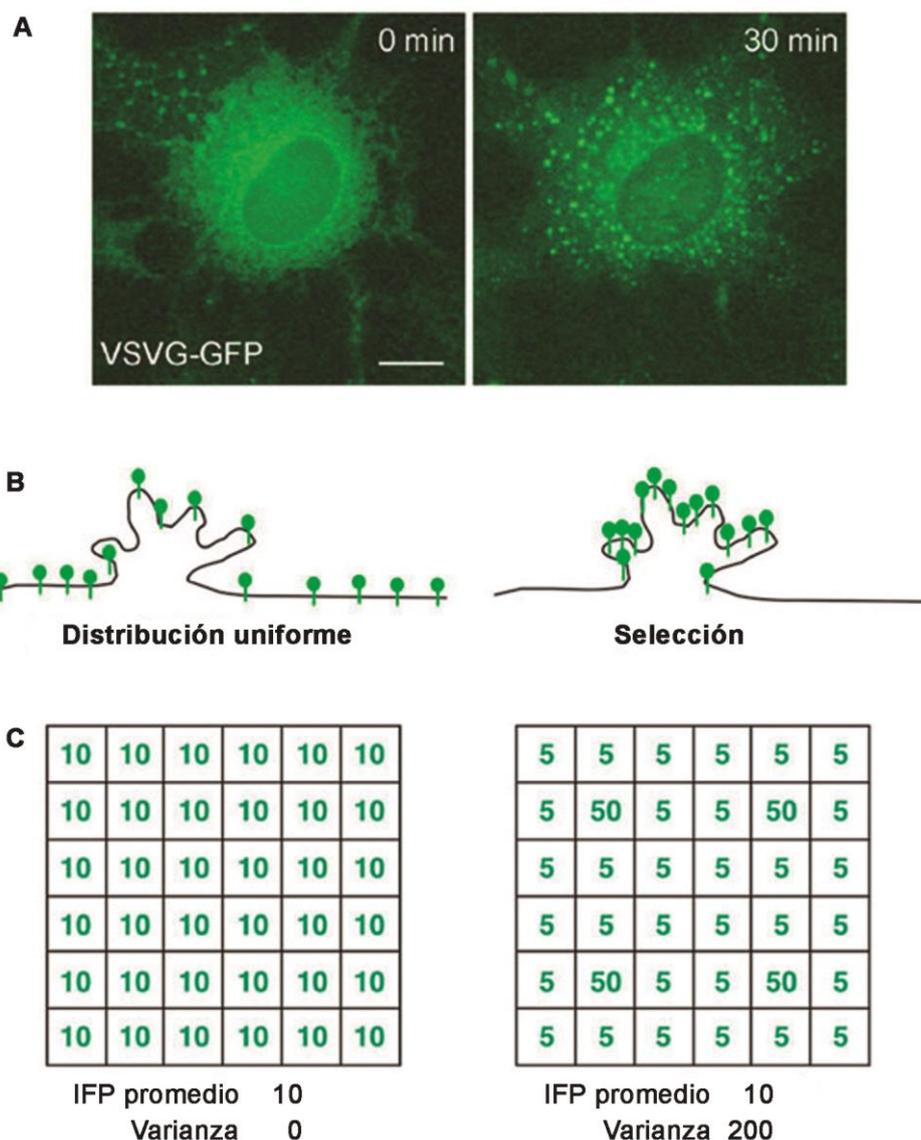


Figura 18: Relación entre la dinámica del “sorting” del cargo en el RE y los valores de intensidad de fluorescencia. (A) Imágenes de células COS7 que expresan VSVG-GFP a los 0 y 30 minutos después de permitir el transporte desde el RE al Golgi mediante el cambio de temperatura (de 40°C a 34°C). La barra de tamaño representa 10 μ m. (B) Esquema que representa la redistribución de VSVG-GFP mostrada en A. (C) Tablas que representan imágenes digitales de un área que incluye varias estructuras punteadas de VSV-G dentro de las células mostradas en A. Ambas tablas tienen los mismo valores de intensidad de fluorescencia de píxeles total (360) y promedio (10): la distribución diferencial se detecta únicamente en los valores de varianza (adaptada de Dukhovny et al., 2008).

Por lo tanto, estos valores de varianza relativa/media relativa de COPII calculados a diferentes tiempos del “Time-lapse” se grafican a lo largo del tiempo para ambos fluoróforos (Figura 19, A-C). Se analiza una estructura COPII estable a lo largo del tiempo, en este caso aproximadamente 15 minutos (de 15.5 a 33.5 minutos de lavado, asterisco, Figura 19, B panel de Sec24), en la cual se asocia Rab1b (asteriscos, Figura 19, B panel de Rab1b) y SialT2 (asteriscos panel SialT2) a los tiempos indicados. En el último panel se visualiza la

superposición de los marcadores (Mezcla) donde se evidencia que a medida que, en una determinada estructura COPII (flechas), Rab1b y SialT2 se concentran y desaparecen a medida que transcurre el lavado de BFA. Este resultado indicaría que Rab1b se asocia a una estructura COPII y concentra el cargo analizado. Además, cuando Rab1b se disocia de COPII, el cargo desaparece y se vuelve a concentrar cuando Rab1b se asocia nuevamente a esa misma estructura COPII.

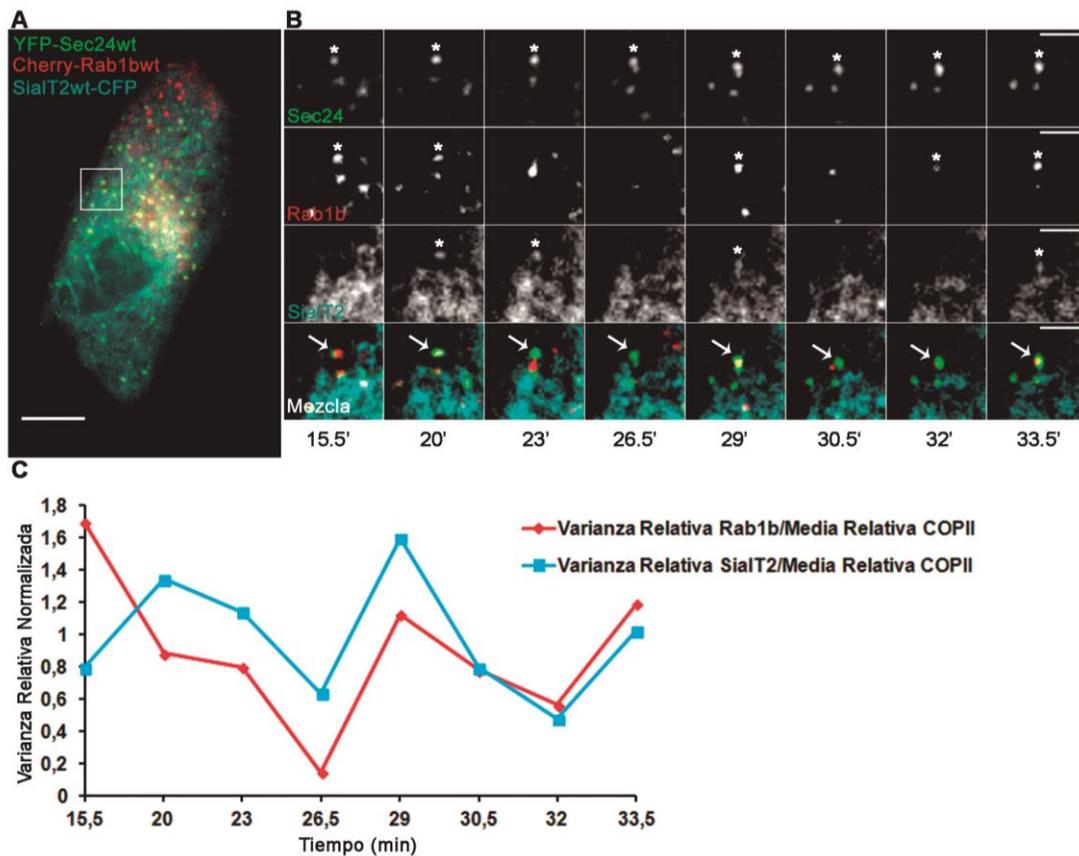


Figura 19: Variación de la intensidad de Cherry-Rab1b y SialT2-CFP, a lo largo del tiempo en relación a estructuras COPII estables. “Time-lapse” en células HeLa co-transfectadas con Cherry-Rab1bwt, YFP-Sec24wt y SialT2-CFP. (A) Imagen representativa de una superposición de Rab1bwt, Sec24wt y SialT2 en un momento del lavado de BFA. (B) Ampliación del recuadro blanco seleccionado en A para cada marcador a diferentes tiempos de lavado de BFA. En la imagen de Sec24 se muestra una estructura COPII estable a lo largo de los tiempos indicados (asterisco). En la imagen de Rab1b se señala la asociación de Rab1b con estructuras COPII (asterisco). La imagen del cargo (SialT2) muestra la aparición o concentración del mismo en una estructura Rab1b-COPII (asterisco). Las flechas indican la estructura COPII que se asocia a Rab1b y concentra cargo a diferentes tiempos de BFA WO. (C) Cuantificación de la varianza relativa tanto de Rab1b como del cargo, con respecto a la IFP relativa de COPII en los tiempos de BFA WO indicados. Las barras de tamaño representan 10 μ m (A) y 3 μ m (B).

Como se muestra en la Figura 19, C, la varianza relativa normalizada de Rab1b varía en los tiempos indicados de lavado de BFA, manifestando un incremento significativo a los 29 minutos donde paralelamente aumenta la varianza relativa normalizada de SialT2. Sin

embargo también se observa que puede haber un aumento de esa varianza de Rab1b sin que se modifique la varianza correspondiente a SialT2, tal como se indica a los 15,5 minutos de lavado de BFA (Figura 19, C).

CONCLUSIONES

- Durante el transporte anterógrado, Rab1b se asocia de manera transitoria y en distintos momentos a diferentes estructuras COPII estables.
- Cuando esta asociación tiene lugar promueve la concentración de cargo en los ERES. Se necesitarían distintos “ciclos” de concentración de Rab1b y cargo antes de que este último abandone el RE.

Discusión

En células eucariotas, la vía secretoria cumple un rol fundamental en la homeostasis celular ya que permite que las numerosas moléculas producidas por la célula lleven a cabo adecuadamente su función al alcanzar su correcto destino, mediante una serie de etapas altamente organizadas y conectadas a través de intermediarios de transporte (vesículas y/o túbulos). La primera de ellas 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 que incluyen las pequeñas GTPasas, proteínas de cubierta, elementos del citoesqueleto y proteínas de anclaje y fusión, entre otras (Lee et al., 2004; Short et al., 2005).

A lo largo de los últimos 25 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). La GTPasa Rab1b coordina las diferentes etapas de la vía secretoria y regula específicamente múltiples procesos como la formación, desplazamiento, “tethering” y fusión de intermediarios de transporte, interaccionando con diferentes proteínas efectoras (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). Si bien se sabe que Rab1b actúa en 2 etapas secuenciales: ERES/COPII-VTCs/COPI, no se conoce con claridad la relación espacio-temporal de estas interacciones durante el transporte de cargo desde el RE al complejo de Golgi.

En este trabajo de tesis (Capítulo 1) se analizaron los mecanismos dinámicos de moléculas que contribuyen/participan en el “sorting” de cargo y su rol en la regulación de la transición ERES (COPII)-VTCs (COPI).

Rab1b y la regulación de la transición ERES (COPII)-VTCs (COPI)

Ensayos de “Time-lapse” han permitido caracterizar *in vivo* la dinámica del complejo COPII en el transporte RE-Golgi, y su relación espacio-temporal con el complejo COPI. De esta manera, se evidenció por primera vez *in vivo* que el transporte RE-Golgi en mamíferos involucra 2 etapas cuyos procesos ocurren secuencialmente. Primero, el cargo se concentra y empaqueta en los ERES de manera dependiente de COPII, luego se manifiesta la asociación de COPI a estas membranas, y finalmente el cargo es segregado de las mismas en intermediarios de transporte con cubierta COPI únicamente, que se dirigen hacia el complejo de Golgi (Stephens et al., 2000).

De manera análoga, en este trabajo de tesis se estudió la participación de Rab1b en la transición de ERES (COPII) a VTCs (COPI) en el transporte RE-Golgi, empleando ensayos de

“Time-lapse” en células vivas para visualizar simultáneamente la movilidad de Rab1b y efectores localizados en ERES o VTCs. Se utilizaron variantes de GFP de marcadores de ERES (YFP-Sec24) y VTCs (GFP-p115) para analizar individualmente la movilidad de estas estructuras. En concordancia con lo publicado por otros autores, se observó que las estructuras marcadas con COPII son relativamente inmóviles y estables, mientras que las estructuras marcadas con p115 son mayoritariamente móviles y describen trayectorias hacia y desde el complejo de Golgi (Stephens et al., 2000; Kirk y Ward, 2007). Además, se analizaron las estructuras marcadas con Rab1b, las cuales presentaron un comportamiento combinado entre COPII y p115, similar a lo previamente descrito (Monetta et al., 2007). Teniendo en cuenta tal comportamiento, y con el objetivo de dilucidar el rol de Rab1b en la transición ERES/COPII-VTCs/COPI, se analizó la movilidad de Rab1b y estas estructuras de manera simultánea. Los resultados presentados muestran que la dinámica heterogénea que presentan las estructuras marcadas con Rab1b, se correlaciona con el comportamiento de las estructuras marcadas con COPII y p115. Sin embargo, esta correlación es parcial, dado que no toda estructura inmóvil o móvil marcada con Rab1b co-localiza con una estructura de comportamiento homólogo marcada con COPII o p115, respectivamente (Figura 11 y 12). Es probable que esta parcial correlación sea consecuencia de la interacción de Rab1b con otros efectores que no fueron analizados en ese ensayo y que poseen una función importante en el transporte, como por ejemplo GBF1, que también co-localiza en estructuras punteadas con Rab1b en la interfase de RE-Golgi pero que su función es activar a Arf1 para el posterior reclutamiento de COPI. Además, estos resultados muestran que la aparición o desvanecimiento de estructuras marcadas con Rab1b, p115 o COPII, ocurre de manera independiente una de la otra (Figura 11 y 12). Este hallazgo indicaría que la asociación de Rab1b no sería necesaria para la formación de las estructuras COPII y p115 ya que muchas de estas estructuras no poseen Rab1b. Sin embargo no se puede afirmar que no es necesaria la presencia de COPII o p115 para que se asocie Rab1b a ERES o VTCs dado que se sabe que Rab1b actúa en 2 etapas y que el análisis de la movilidad simultánea sólo nos permite observar a Rab1b asociada con COPII o con p115. Estas asociaciones son mayoritariamente transientes, y nuestros resultados sugieren que las mismas podrían ocurrir al mismo tiempo o de forma simultánea en etapas espacialmente distintas del transporte RE-Golgi.

Recientemente se ha demostrado que el mecanismo involucrado en el reclutamiento de Rab1b requiere de p115, la cual actúa como una proteína GDF promoviendo el desplazamiento de la proteína GDI y, como consecuencia, permite la asociación de Rab1b a las membranas de los VTCs (Guo y Linstedt, 2013). De manera interesante, se observó que la intensidad de la marca

de Rab1b es variable a lo largo de algunos túbulos marcados con p115. Teniendo en cuenta que Rab1b sería reclutada por p115 en los VTCs, tales observaciones indicarían que la presencia de subdominios o focos de Rab1b en estas estructuras es dependiente de p115. Una vez asociada, Rab1b recluta a GBF1 en estas membranas, la cual a su vez promueve el reclutamiento del complejo COPI y la consiguiente maduración de VTCs (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). Sin embargo, no están del todo claros los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la transición ERES/COPII-VTCs/COPI, el rol que cumple Rab1b en la coordinación de esta etapa, y cómo es regulado el ciclo o dinámica de asociación/disociación de la misma.

Debido a la gran variabilidad de comportamientos dinámicos de Rab1b como consecuencia del continuo movimiento anterógrado y retrógrado de membranas entre el RE y el complejo de Golgi, el uso de BFA permitió alterar este equilibrio bloqueando el transporte anterógrado sin alterar el retrógrado (Fujiwara et al., 1988; Lippincott-Schwartz et al., 1989). En presencia de BFA, las proteínas del Golgi se redistribuyen y acumulan en el RE, donde se sincroniza su salida o transporte anterógrado sin alterar la distribución de COPII ni la estructura de los ERES (Orci et al., 1993; Lippincott-Schwartz et al., 2000). Teniendo en cuenta que Rab1b es necesaria para la concentración de cargo en ERES, y que posteriormente induce la asociación de COPI en los VTCs (Monetta et al., 2007; Slavin et al., 2011), hipotetizamos que cuando toda la salida de cargo está sincronizada en RE, Rab1b se redistribuye principalmente en ERES.

Muchos autores señalan que la cuantificación de los datos provenientes de imágenes obtenidas empleando microscopía de fluorescencia es necesaria para evaluar la localización y dinámica de las proteínas que regulan el transporte de membranas, asegurando así la relevancia biológica de las mediciones obtenidas (Singan et al., 2012). El análisis cuantitativo de la comparación de la co-localización de Rab1b con marcadores de ERES y VTCs evidenció un incremento leve pero significativo de la co-localización de Rab1b en ERES cuando la salida de cargo está sincronizada en RE en relación a la situación control (-BFA), mientras que no hay cambios significativos de la cantidad de Rab1b en VTCs entre estas 2 situaciones (Figura 14). Este mínimo incremento de co-localización de Rab1b en ERES sugiere la presencia de una subpoblación de estructuras ERES que interactúan con Rab1b.

Por otro lado, p115 (que también cumple una función importante en los ERES interactuando con proteínas SNARE de las vesículas COPII (Allan et al., 2000), aumenta levemente su cantidad en los ERES, similar a lo que ocurre con Rab1b (Figura 14). Este hallazgo, junto con datos complementarios que indican que Rab1b y p115 presentan distribuciones similares y la co-

localización entre ellas no varía con el agregado de BFA, sugiere que necesitan una de la otra para llevar a cabo sus funciones. Posiblemente p115 estaría involucrada en el reclutamiento de Rab1b en los ERES, similar a lo que ocurre en VTCs (Guo y Linstedt, 2013), para que posteriormente Rab1b sea activada por el complejo TRAPI, regulando y/o coordinando así la concentración de cargo. Contrariamente, algunos autores proponen que Rab1b recluta a p115 en ERES (Allan et al., 2000). Sin embargo, otros autores evidenciaron que p115 permanece principalmente asociada a membranas en células que expresan la mutante dominante negativa Rab1bN121I y también cuando se induce el silenciamiento específico de Rab1b (Alvarez et al., 2003; Monetta et al., 2007). En este sentido se ha reportado que p115 se asocia a las membranas en ausencia de Rab1b activada, mientras que la misma estabiliza la asociación de p115 a las membranas (Brandon et al., 2006). Es probable que ambas proteínas se regulen entre sí para llevar a cabo sus funciones eficientemente, y que otras proteínas participen en la especificidad de estos eventos o procesos. Alternativamente, podrían existir 2 poblaciones de p115, uno que necesita de Rab1b para interactuar con proteínas SNARE en procesos de fusión de membranas, y otro involucrado en el reclutamiento de Rab1b en ERES para regular el “sorting” de cargo en vesículas COPII.

En la interfase ERES-VTCs, Rab1b recluta a GBF1, la cual participa en el reclutamiento de COPI mediante el intercambio de GDP por GTP en Arf1 (Monetta et al., 2007). BFA inhibe la actividad de GBF1, promoviendo así la disociación de Arf1 de las membranas y, por consiguiente, impide el reclutamiento de COPI en la interfase ERES-VTCs (Garcia-Mata et al., 2003). En presencia de BFA, GBF1 se asocia establemente a las membranas del RE y, como consecuencia, aumenta su co-localización con proteínas marcadoras de RE (Szul et al., 2005). De manera análoga, se ha reportado que cuando se estabiliza a Rab5 en las membranas de endosomas tempranos (mediante la expresión de la mutante activa Rab5Q79L), se incrementa su co-localización con marcadores de endosomas tempranos como EEA1 (Rink et al., 2005). Por lo tanto, en presencia de BFA, Rab1b no puede interactuar/reclutar a GBF1 en VTCs debido a que GBF1 está establemente asociada a RE. La falta de GBF1 en su correcto lugar de acción impide que el transporte avance a la siguiente etapa, por lo que Rab1b se asocia por más tiempo en los ERES (Figura 15). Si bien el tiempo de asociación de Rab1b en estructuras COPII está considerablemente aumentado en presencia de BFA, la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las membranas de los ERES no se modifica y en aproximadamente 120 segundos se recupera el ~90% de la fluorescencia inicial de Cherry-Rab1b con un $t_{1/2}$ de recuperación de la fluorescencia de ~20 segundos (Figura 16), similar al observado para componentes de COPII como Sec13 ($t_{1/2}$ ~38 segundos; Stephens et al., 2000;

Slavin et al., 2011). Este hallazgo se complementa con resultados de otros autores que demostraron que la dinámica de asociación/disociación de componentes de la cubierta COPII no se modifica en presencia de BFA (Ward et al., 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que ante el bloqueo del transporte y la falta de GBF1 disponible en el citosol, Rab1b permanece asociándose/disociándose en las mismas estructuras “esperando” que GBF1 esté disponible para reclutarla en los VTCs y así promover la maduración de los mismos mediante el reclutamiento de COPI. Además, la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las membranas de los ERES tampoco se modifica en presencia de Nocodazol (Figura 16) similar a lo que ocurre en el complejo de Golgi (Monetta et al., 2007), sugiriendo que Rab1b se asocia a las mismas mediante reclutamiento directo de moléculas de Rab1b disponibles en el pool citosólico, en forma independiente del transporte de intermediarios mediado por microtúbulos.

Mediante la expresión de la mutante dominante negativa de GBF1, E794K, se analizó si el incremento del tiempo de asociación de Rab1b en ERES es un efecto específico de GBF1, ya que si bien pierde su actividad GEF, permanece establemente asociada a las membranas de VTCs promoviendo un arresto del transporte al inhibir el reclutamiento de COPI (García-Mata et al., 2003). El tiempo de asociación de Rab1b a ERES en el contexto de E794K es similar al observado en células tratadas con BFA (Figura 15), lo que sugiere que el tiempo de asociación de Rab1b en estructuras COPII es dependiente del reclutamiento y/o actividad de GBF1 y del reclutamiento de COPI en la interfase de ERES-VTCs. El bloqueo del transporte también ocurre cuando se expresa la mutante dominante negativa Arf1T31N. GBF1 se une a la misma pero no puede catalizar el intercambio de GDP por GTP y, como consecuencia, GBF1 se estabiliza en la membrana y su dinámica de asociación/disociación está alterada (Szul et al., 2005). De manera análoga, ensayos de FRAP realizados en presencia de la dominante negativa de GBF1, E794K, indican que Cherry-Rab1b recupera, en ERES, menos del 60% de la intensidad de fluorescencia inicial (incremento de la fracción inmóvil de Rab1b, Figura 16), sugiriendo que cuando Rab1b interacciona con la mutante E794K, se estabiliza en las membranas de ERES, y sería necesario que GBF1 se disocie para la posterior disociación de Rab1b de estas membranas. Teniendo en cuenta que la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a la membrana no se modifica cuando GBF1 está estabilizada en el RE (+BFA, Figura 16), sumado a resultados de otros autores que evidenciaron que la unión de GTP a Arf1 promueve el desplazamiento de GBF1 de las membranas (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005), es probable que una vez que GBF1 lleva a cabo su función de GEF sobre Arf1, se disocie de las membranas permitiendo la disociación posterior de Rab1b. Alternativamente, luego de que GBF1 promueve la activación de Arf1,

Arf1-GTP podría regular, mediante la interacción con efectores, la actividad GAP sobre Rab1b para que se disocie de las membranas. A favor de esta hipótesis, se ha reportado que la progresión de endosomas tempranos a tardíos involucra un mecanismo que consiste en la transición de Rab5 a Rab7. Así, Rab5 que se encuentra en endosomas tempranos, recluta a un complejo que tiene actividad GEF sobre Rab7, clase C/VPS HOPS, promoviendo el reclutamiento de la misma y su activación para la posterior transición a endosomas tardíos. Finalmente Rab5 es removida de las membranas como consecuencia de un proceso donde los efectores de Rab7 incrementan la actividad GAP sobre Rab5 (Rink et al., 2005).

En resumen, es fundamental para la homeostasis y la vida de células eucariotas que todas las RabGTPasas regulen correctamente las distintas etapas del transporte intracelular de proteínas y lípidos. Para cumplir su función, las proteínas Rab necesitan localizarse específicamente en las membranas de las diferentes organelas que forman parte de la vía secretoria. En este sentido, se ha reportado que principalmente las proteínas GEF son las que determinan que las proteínas Rab sean llevadas específicamente a una determinada membrana (Blümer et al., 2013). Así, las proteínas GEF Rabex-5, DrrA y Rabin8 constituyen la maquinaria mínima para llevar desde el citosol a la membrana específica las proteínas Rab5A, Rab1A y Rab8, respectivamente, ya que el empleo de un sistema que permite la localización ectópica de las proteínas GEF en las membranas de mitocondrias, promueve en las mismas el reclutamiento de sus respectivas proteínas Rab (Blümer et al., 2013). Resultados de este trabajo sumados a datos publicados por otros autores, permiten comprender mejor cómo Rab1b estaría regulando la transición de COPII a COPI, indicando que la misma población de Rab1b coordinaría esta etapa. Por lo tanto, el complejo TRAPI, que se une a vesículas COPII mediante la interacción con Sec23, posee actividad GEF sobre Rab1b promoviendo su activación en las membranas de los ERES (Jones et al., 2000), posiblemente con la ayuda de p115 para reclutarla a estas membranas. Una vez activada, Rab1b interacciona con su próximo efector, GBF1, para que reclute a Arf1. En este punto, Sar1 y Arf1 pueden estar activas en la misma membrana, por lo que se lleva a cabo el reclutamiento de COPI dando lugar a la transición hacia VTCs inmaduros o nacientes (Hughes and Stephens, 2008). Este complejo es un poco inestable debido a que se empieza a ensamblar la cubierta COPI antes de que pueda desensamblarse completamente la cubierta COPII, por lo que los VTCs inmaduros constituyen una etapa intermedia que aún contienen la capa interna de la cubierta COPII (Sec23 y Sec24) (Hughes and Stephens, 2008). Es posible que Rab1b contribuya a la estabilidad de este complejo, coordinando así la transición efectiva de COPII a COPI. Una vez que los VTCs maduran y pierden por completo la cubierta COPII y el complejo TRAPI, p115 sería la

encargada de seguir reclutando a Rab1b en esas membranas desde el citosol mientras que Rab1a a su vez estabiliza la asociación de p115, para que los intermediarios COPI puedan alcanzar el cis-Golgi y fusionarse efectivamente con sus membranas.

Por otra parte, las proteínas GAP cumplen un rol importante en la regulación de las proteínas Rab, ya que las inactivan específicamente interfiriendo con los procesos en los que está involucrada cada una. En este sentido, se ha reportado que si se interfiere con la actividad de la proteína GAP de Rab1b, se altera su función implicada en el transporte desde el RE de las glicoproteínas del virus Herpes Simple 1 (Zenner et al., 2011). TCD1D20 ha sido definida como la proteína GAP específica para Rab1b, y se encuentra a lo largo del RE interaccionando con proteínas del retículo (Haas et al., 2007). Si bien esta proteína junto con el complejo TRAPI estarían regulando el ciclo de Rab1b entre la forma unida a GDP (inactiva) y la forma unida a GTP (activa) en los ERES, poco se sabe sobre cómo este ciclo es controlado en los VTCs. Resultados de esta tesis junto con los de otros autores, sugieren que p115 actúa como una proteína GDF para desplazar a la proteína GDI y permitir la asociación de Rab1b a los VTCs. Sin embargo no se conoce aún cuál es la proteína GEF que activa específicamente a Rab1b en esta estructura. Una vez que es activada, recluta a GBF1 la cual a su vez recluta a Arf1 promoviendo el intercambio de GDP por GTP. Así, Arf1 activada interacciona con diferentes efectores y posiblemente a través de ellos regule la disociación de Rab1b de las membranas, dando lugar a un nuevo ciclo, de manera similar a lo que ocurre en la conversión de endosomas tempranos a tardíos donde Rab5 recluta a la GEF de Rab7 y una vez que esta se activa se cree que promovería la disociación de Rab5 de esas membranas (Rink et al., 2005).

Rab1b y el “sorting” de cargo en ERES

Como se mencionó anteriormente la co-localización entre Rab1b y COPII es parcial (Figura 14), lo que sugiere que Rab1b actuaría en una subpoblación de estructuras COPII. A nivel del transporte endosomal, algunos autores proponen la existencia de subpoblaciones de endosomas tempranos que poseen Clatrina, donde participan proteínas específicas que regulan el destino de cada una de ellas. Así, la proteína SNX15 interacciona con la cubierta Clatrina de una subpoblación de endosomas tempranos, promoviendo específicamente un mecanismo que permite la degradación lisosomal de ciertos cargos contenidos en estos endosomas (Danson et al., 2013). De manera análoga, es posible que Rab1b regule la función de una subpoblación de vesículas COPII, mientras que existan paralelamente otras subpoblaciones heterogéneas destinadas a otras funciones que prescindan de Rab1b. Sin embargo, Rab1b interacciona con todas las estructuras COPII pero no simultáneamente sino en

distintos momentos durante el transporte anterógrado de cargo. En otras palabras, cuando se inicia el lavado de BFA prácticamente sólo hay transporte anterógrado y se observó que la totalidad de las estructuras COPII estables analizadas se asocian a Rab1b en algún momento del lavado de BFA (Figura 17). Estas observaciones sugieren que durante el transporte anterógrado de cargo, las estructuras estables de COPII se asocian a Rab1b en distintos momentos, descartando así la presencia de subpoblaciones de COPII. Alternativamente, podrían existir subpoblaciones de COPII en los ERES encargadas del transporte de distintos tipos de cargo, donde Rab1b participaría regulando el “sorting” de los mismos en todas las estructuras COPII.

Proteínas cargo se concentran en ERES de manera dependiente de Rab1b, y su salida está demorada o retrasada cuando se inhibe la expresión de Rab1b (Slavin et al., 2011). El uso de BFA permitió la redistribución en el RE de proteínas del Golgi, como SialT2, que se concentran en los ERES cuando se restablece el transporte anterógrado. Realizando ensayos de “Time-lapse” de triple marca, se evidenciaron focos de concentración de SialT2 en estructuras COPII donde se había observado la asociación de Rab1b en distintos momentos a medida que transcurre el transporte anterógrado (Figura 17), indicando que durante el transporte anterógrado, es necesaria la asociación de Rab1b en distintos momentos a todas las estructuras COPII pre-existentes y estables para promover la concentración de cargo en los ERES. Además, se observó que cuando Rab1b se disocia de COPII los focos de concentración de SialT2 desaparecen y se vuelve a concentrar SialT2 cuando Rab1b se asocia nuevamente a esa misma estructura COPII, lo que sugiere que se producirían distintos “ciclos” de concentración de Rab1b y cargo antes de que este último abandone el RE.

Rab1b y COPII son esenciales para que el cargo se concentre en ERES y luego sea transportado hacia su destino final. Sin embargo, se observaron algunas estructuras COPII asociadas a Rab1b que no evidenciaron una concentración de SialT2. Posiblemente, si se hubieran tomado las imágenes por más tiempo, todas las estructuras COPII podrían haber concentrado SialT2 en algún momento del lavado de BFA. Alternativamente, teniendo en cuenta que SialT2 es un cargo transmembrana, es probable que exista una subpoblación de estructuras COPII involucrada en el “sorting” de otras proteínas cargo. En este sentido, algunos autores proponen que las proteínas cargo transmembrana dependen de la maquinaria COPI mientras que las solubles alcanzan la membrana plasmática en ausencia de esta cubierta (Szul et al., 2007), por lo que es posible que exista un mecanismo alternativo mediante el cual Rab1b regula el transporte de proteínas cargo solubles en una subpoblación de estructuras COPII, independientemente de la función de COPI.

Por otro lado, el cargo regula a COPII ya que estabiliza a los componentes de la cubierta COPII después de que Sar1 es liberada de las membranas de los ERES, promoviendo así un mecanismo que previene el desensamblaje prematuro del complejo COPII (Forster et al., 2006). Por lo tanto, el cargo también posee un rol importante para asegurar su adecuado transporte. Complementariamente, se ha reportado que el cargo es capaz de modular la velocidad o cinética de transporte entre endosomas tempranos y tardíos, mediante un incremento de la activación de Rab5, que lleva a una demora en la liberación de la misma de las membranas que contienen cargo (Di Fiore and De Camilli, 2001). De manera similar, es probable que en los ERES la presencia de cargo sea capaz de regular a Rab1b, así como lo hace con COPII, para garantizar su adecuado y efectivo “sorting”.

Los resultados obtenidos en esta tesis sumados a datos descritos por otros autores permiten proponer un modelo que resume los mecanismos moleculares implicados en la participación de Rab1b principalmente en el “sorting” de cargo y en la regulación de la transición ERES-VTCs (Figura 20). Durante el transporte anterógrado de cargo, Rab1b se asocia a todas las estructuras estables de COPII pero no simultáneamente sino en distintos momentos. Además, esta asociación es necesaria para promover la concentración de cargo en los ERES. Sin embargo, en algunas estructuras COPII asociadas a Rab1b no se concentra el cargo analizado, por lo que podría existir una subpoblación de estructuras COPII involucrada en el “sorting” de otras proteínas cargo.

Por otro lado, tanto en presencia de BFA como cuando se expresa la mutante GBF1-E794K, no se produce “sorting” de cargo. En ambos casos, p115 reclutaría a Rab1b en ERES directamente desde las reservas citosólicas, en forma independiente del transporte de intermediarios mediado por microtúbulos. En presencia de BFA, Rab1b activada no puede interaccionar/reclutar a GBF1 en VTCs, por lo que el transporte está bloqueado y Rab1b se asocia por más tiempo en los ERES sin modificar su dinámica de asociación/disociación a esas membranas. En el contexto de E794K, GBF1 se asocia establemente a las membranas y Rab1b también permanece asociada por más tiempo en los ERES pero su dinámica de asociación/disociación está modificada, por lo que resulta necesario para la progresión del transporte que GBF1 se disocie para dar lugar a la posterior disociación de Rab1b.

Así, Rab1b actúa en 2 etapas secuenciales, primero promoviendo el “sorting” de cargo en ERES, y luego en la interfase ERES-VTCs recluta a GBF1 para que esta active a Arf1, la cual a su vez recluta la cubierta COPII y quizás regula la actividad GAP sobre Rab1b para que se disocie de las membranas. Una vez que los VTCs maduran, p115 sigue reclutando a Rab1b desde las

reservas citosólicas para conservar la cubierta COPI hasta que los intermediarios fusionen con las membranas del cis-Golgi.

Si bien las Rab GTPasas coordinan diferentes etapas del transporte intracelular (Zerial and McBride, 2001; Grosshans et al., 2006; Stenmark, 2009), poco se sabe en relación al rol de las mismas en la biogénesis de los intermediarios de transporte, etapa que involucra la deformación de la membrana donora (“budding”), “sorting” del cargo y mecanismos de fisión en el lugar y tiempo correctos. Existen evidencias de que la GTPasa Rab6 forma parte de un mecanismo que implica su interacción con elementos del citoesqueleto, como miosina II, en el proceso de fisión de vesículas de transporte a nivel del complejo de Golgi (Miserey-Lenkei et al., 2010). Teniendo en cuenta además, que Rab1 interacciona con una proteína citosólica, MICAL-1, que a su vez interacciona con filamentos intermedios del citoesqueleto (Weide et al., 2003), Rab1b podría regular espacial y temporalmente la maquinaria del citoesqueleto para llevar a cabo procesos de fisión de intermediarios de transporte a partir de los ERES.

En conjunto nuestros resultados, proveen nuevos datos relacionados al rol de la GTPasa Rab1b en el “sorting” de cargo y en la coordinación de las etapas del transporte vesicular que se llevan a cabo entre los distintos compartimientos que integran la interfase RE-Golgi, principalmente la transición de vesículas COPII-COPI. Futuros estudios estarán destinados a dilucidar aún más los mecanismos que involucran a Rab1b en diferentes eventos de transporte, desde la producción o biogénesis de intermediarios de transporte en ERES hasta la fusión final de los mismos con las membranas del complejo de Golgi.

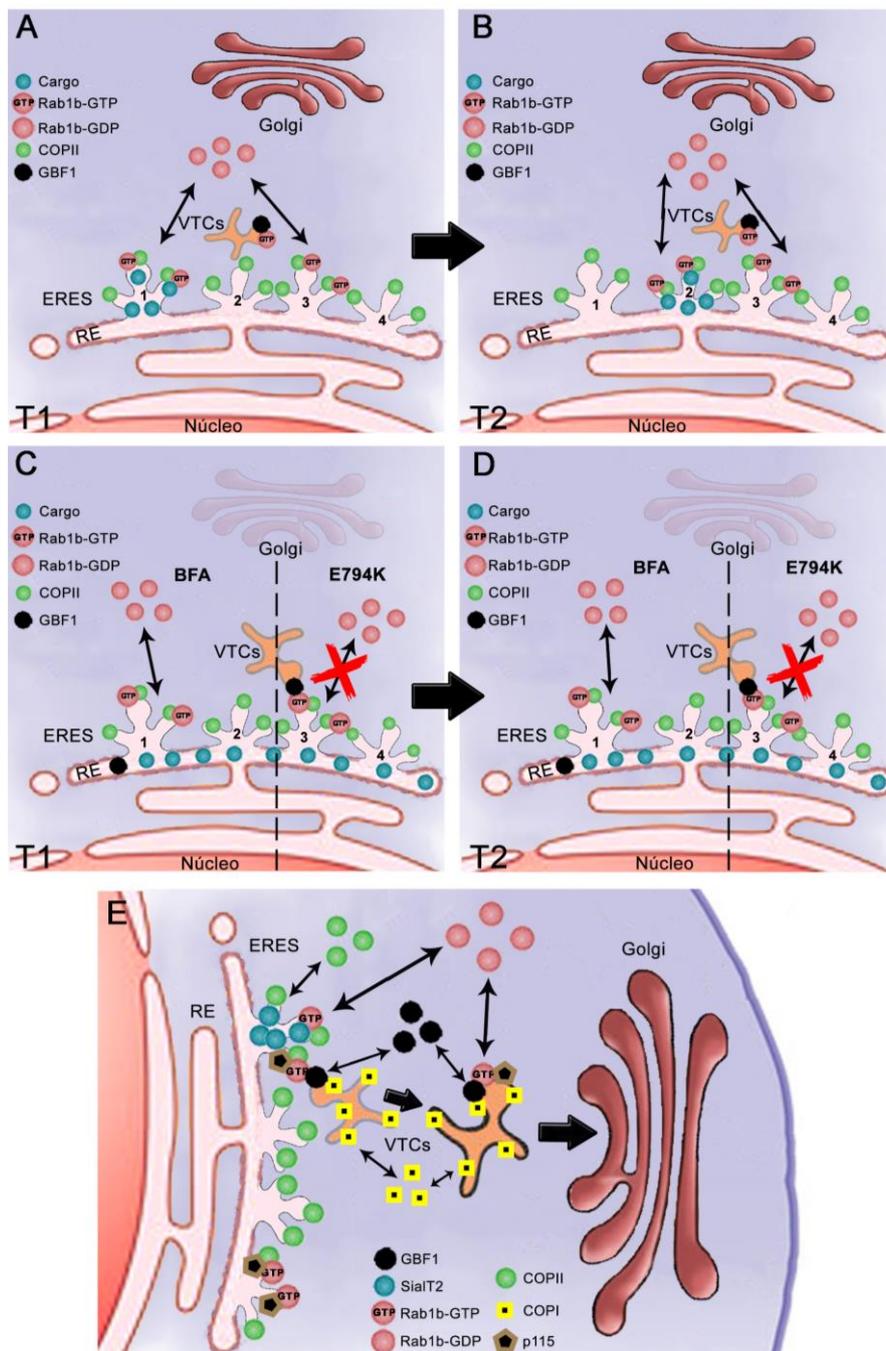


Figura 20: Modelo de acción de Rab1b. (A-D) Esquema representativo de la participación de Rab1b en el “sorting” de cargo (SialT2) en la interfase ERES-VTCs. (A y B) Situación de equilibrio del transporte. Rab1b se asocia a ERES (COPII) en distintos momentos (T1, ERES 1 y 3, T2, ERES 2 y 3), y concentra cargo en algunas de esas estructuras COPII. (C y D) Situación en presencia de BFA y la mutante E794K. En ambas condiciones las proteínas del Golgi se redistribuyen al RE y no se produce “sorting” de cargo en ERES. Además, Rab1b permanece asociada por más tiempo a los mismos ERES (T1 y T2, ERES 1 y 3). Notar que, en presencia de BFA, GBF1 se encuentra en RE y la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las membranas no se modifica. Contrariamente con E794K, que se encuentra establemente asociada a las membranas, Rab1b interaccionaría con la misma y su dinámica de asociación/disociación se altera.

(E) Esquema general de la participación de Rab1b en la transición RE-Golgi. Rab1b actúa en 2 etapas secuenciales, primero promoviendo el “sorting” de cargo en ERES, y luego desde estas membranas reclutaría a GBF1 para promover la transición hacia los VTCs con el consiguiente reclutamiento de COPI. En VTCs, p115 sigue reclutando a Rab1b desde las reservas citosólicas para conservar la cubierta COPI, promoviendo así la maduración de estos intermediarios y la llegada del cargo al Golgi.

Capítulo 2

Introducción

Otras funciones de las Rab GTPasas

La función más explorada de las Rab GTPasas es su participación en el transporte de membranas ya que brindan especificidad a los eventos relacionados al mismo y participan en la formación de vesículas, transporte y/o fusión de las mismas a lo largo de las vías endocítica y exocítica (Bonifacino and Glick, 2004). Sin embargo, las Rab no sólo participan en la regulación del transporte, numerosos trabajos han demostrado que la función de las proteínas Rab es fundamental en los mecanismos de transducción de señales, los cuales están destinados a modular la homeostasis entre los distintos compartimientos (Bucci and Chiariello, 2006). Las Rab GTPasas, a través de sus efectores, participan en la regulación de vías de transducción de señales involucradas en la proliferación celular, la respuesta inmune innata y la fragmentación de compartimientos durante la división celular. Por ejemplo, los niveles de expresión de Rab25 se relacionan con la agresividad en ciertos cánceres de células epiteliales de ovario y mamas, probablemente mediante la activación de la vía PI3K/Akt (Cheng et al., 2004). Asimismo, las proteínas Rab pueden controlar la expresión de genes mediante la modulación de la actividad de factores de transcripción.

Las células eucariotas poseen numerosas moléculas involucradas en la transducción de señales intracelulares. Además de las Rab GTPasas, se encuentran las proteínas G heterotriméricas, nucleótidos cíclicos como AMP cíclico (AMPC) y GMP cíclico (GMPC), ión calcio, derivados fosfoinositoles como fosfatidilinositoltrifosfato (PIP3), diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP3), y una gran variedad de proteínas fosfatasa y quinasas (Vivanco and Sawyers, 2002). Dentro de las quinasas, se encuentran las proteínas activadas por mitógeno MAP-quinasas o MAPK (por Mitogen Activated Protein Kinase en inglés), las cuales son activadas por numerosos estímulos celulares y/o externos (Pearson et al., 2001). Las MAPK a su vez activan diferentes proteínas tales como factores de transcripción, proteínas quinasas y proteínas del citoesqueleto. Si bien las MAPK se dividen en diferentes grupos, JNK, ERK y p38 constituyen las principales quinasas que controlan la expresión de diversos genes mediante la regulación de factores de transcripción, que se activan por fosforilación (Murphy and Blenis, 2006).

Las proteínas Rab son primordiales para mantener la homeostasis celular debido a que regulan adecuadamente los diferentes compartimientos de la vía secretoria mediante la activación de distintas vías de traducción de señales (Sallese et al., 2006).

Rab1b y transducción de señales

La función de numerosas Rab ha sido estudiada gracias al empleo de una herramienta muy útil como son las mutaciones puntuales en dominios conservados, produciendo la estabilización de las proteínas Rab en su forma unida a GTP, GDP o libre de nucleótidos (Feig and Cooper, 1988). Así, se ha logrado comprender el mecanismo de acción y las funciones de las Rab no sólo en eventos de transporte sino también en eventos de señalización intracelular.

Específicamente, algunos de los mecanismos funcionales de la GTPasa Rab1b se conocen por el empleo de las siguientes mutantes:

- 1- Mutante dominante negativa Rab1b-S22N, donde se sustituye Serina (S) por Asparragina (N). Esta sustitución genera una mutante con gran preferencia por GDP.
- 2- Mutante dominante negativa Rab1b-N121I, donde se sustituye Asparragina (N) por Isoleucina (I). Este cambio genera una disminución de la afinidad tanto por GDP como por GTP (“mutante vacía”).
- 3- Mutante activa Rab1b-Q67L donde se sustituye Glutamina (Q) por Leucina (L). Esta mutación bloquea la actividad GTPasa intrínseca estabilizando a las proteínas Rab en su forma activa, unida a GTP.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la sobre-expresión de Rab1bwt modula específicamente la expresión de 219 genes que se agrupan en funciones múltiples tales como transporte vesicular, factores de transcripción, proteínas estructurales, transducción de señales y otras (Romero et al., 2013). Además, Rab1b es capaz de modular la actividad promotora de algunas de estas proteínas, mediante la activación de la vía de la p38-MAPK que activaría a su vez (por fosforilación) al factor de transcripción CREB (por cAMP Response Element Binding Protein en inglés) para regular transcripcionalmente los genes analizados (Romero et al., 2013).

Por lo tanto, Rab1b participa en múltiples etapas del transporte RE-Golgi, incluyendo la regulación de procesos del transporte de membranas, y la activación de cascadas de señalización que llevan a la regulación de la transcripción de los genes que codifican para las proteínas implicadas en este proceso.

Rab1b se expresa en forma ubicua en tejidos humanos, sin embargo, en tejidos que poseen alta actividad secretoria, como tiroides, placenta y células epiteliales bronquiales los niveles de

ARNm de Rab1b, así como de otras proteínas involucradas en el transporte de membranas, se encuentran significativamente elevados (Gurkan et al., 2005).

Debido a que este capítulo está enfocado en caracterizar el impacto de los cambios de los niveles de Rab1b en sistemas secretorios, se utilizó específicamente una línea celular de tiroides de rata, denominada FRTL5 (por Fischer Rat Thyroid cell Line en inglés). A continuación se describirá detalladamente el sistema tiroideo.

Sistema tiroideo

La tiroides es una glándula endócrina compuesta por numerosos folículos agrupados que poseen una amplia red de capilares. Estos folículos están constituidos por las células epiteliales foliculares o tirocitos dispuestos en monocapa alrededor de una cavidad central que contiene coloide. Los tirocitos son células polarizadas compuestas por una membrana basal del lado del torrente circulatorio y una apical que da al coloide. El principal constituyente del coloide es la tiroglobulina (Tg), la cual es una glicoproteína específica del tejido de tiroides, y el precursor de las hormonas tiroideas (HT).

Para la síntesis y secreción de las HT, las células foliculares realizan una serie de funciones especializadas: 1) Captación del yoduro activamente mediante la proteína NIS (por Sodium-Iodide Symporter en inglés), que concentra al mismo de manera dependiente de sodio; 2) Transporte del yoduro desde la membrana basal a la membrana apical, donde se localiza la proteína Pendrina (PDS) que traslada el yoduro al coloide; 3) Oxidación del yoduro (donde participa el peróxido de hidrógeno) mediante una enzima específica denominada tiroxidasa (DUOX2) dependiente de Ca^{2+} y NADPH, la cual oxida el yoduro para convertirlo en yodonio; 4) Incorporación del yodonio a la Tg (yodación) mediante la tiroperoxidasa (TPO), para producir las monoyodotirosinas (MIT) y diyodotirosinas (DIT) hormonalmente inactivas; 5) Acoplamiento de las yodotirosinas MIT y DIT, mediante la acción de TPO, para formar las yodotironinas hormonalmente activas, T_4 y T_3 (Figura 21).

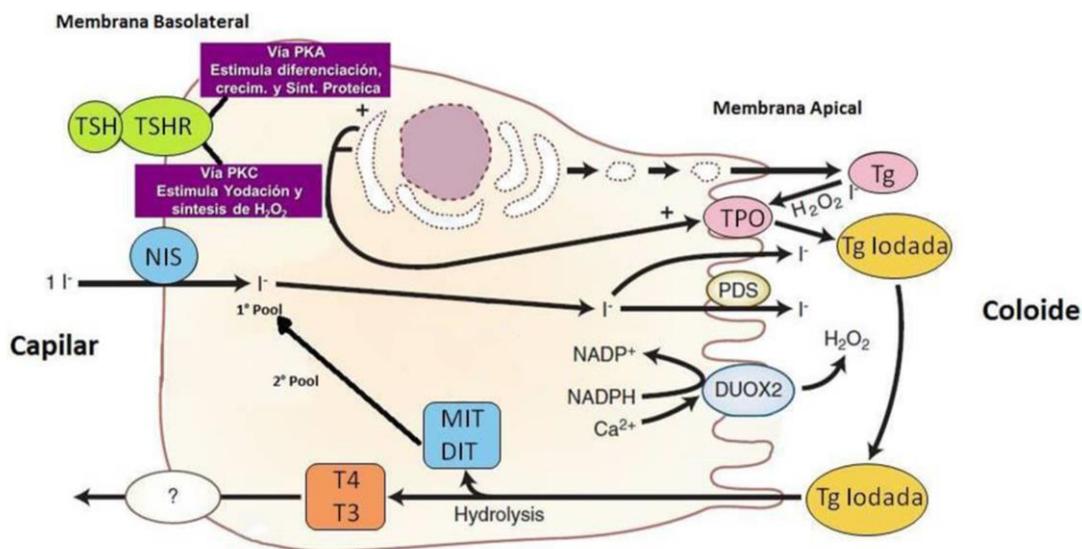


Figura 21: Síntesis de hormonas tiroideas

Esquema que representa la síntesis de las hormonas tiroideas T₃ y T₄ en las células foliculares de la glándula tiroides (adaptada de Polonsky et al., 2011).

Una vez sintetizadas, las hormonas se almacenan en el interior de los tirocitos hasta que se induce su liberación. La T₄ constituye aproximadamente el 97% de las hormonas metabólicamente activas secretadas por la glándula tiroides. Sin embargo, debido a que casi toda la T₄ termina convertida en T₃ en los tejidos, ambas son importantes funcionalmente (Carrasco et al., 2005).

Las HT están involucradas en la transcripción de numerosos genes, lo que desencadena la producción de nuevas enzimas, proteínas estructurales y de transporte, aumentando así la actividad funcional de todo el organismo.

La síntesis y secreción de HT están reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. En el núcleo paraventricular del hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) cuya función principal es inducir la síntesis y secreción de la hormona estimuladora de tiroides (tirotrópina o TSH por Thyroid-Stimulating Hormone en inglés) en la hipófisis anterior o adenohipófisis, mediante un proceso que involucra la entrada de calcio y la activación de la proteína quinasa C. La TSH se une a su receptor de membrana en los tirocitos y estimula la secreción de HT. Además existe un mecanismo de regulación por retroalimentación negativa que contribuye a la homeostasis hormonal. En este mecanismo las HT actúan directamente sobre la hipófisis inhibiendo la liberación de TSH y sobre el hipotálamo inhibiendo la secreción de TRH.

Numerosas investigaciones se han realizado sobre múltiples aspectos relacionados a las células foliculares de tiroides, gracias a que fue posible generar en cultivo una línea celular derivada de tiroides de rata (FRTL5). Estas son capaces de mantener las características bioquímicas y morfológicas representativas de cultivos primarios de células foliculares de tiroides (Ambesi-Impiombato et al., 1980). Las células FRTL5 son estimuladas por la TSH, promoviendo la síntesis y secreción de tiroglobulina (Van Heuverswyn et al., 1984), y la síntesis de NIS (Kogai et al., 1997). TSH es el principal regulador del crecimiento y diferenciación de tiroides. Además, modula todas las etapas involucradas en la síntesis de las hormonas tiroideas, incluyendo la captación de yodo y la expresión génica de NIS (Kogai et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, NIS transporta hacia el interior de las células FRTL5 2 iones de sodio junto con 1 ión de yodo. Si bien NIS es una glicoproteína localizada en la membrana basolateral de los tirocitos, también se expresa en otros tejidos tales como glándulas salivales, mucosa gástrica y glándula mamaria, donde interviene en el transporte activo de yodo. Además, NIS es capaz de transportar otros aniones, por ejemplo el perclorato y el tiocianato, que inhiben la acumulación de yodo en la glándula tiroides por competición con dicho anión.

El gen de NIS de rata posee una región promotora localizada entre los pares de bases +1 y -420 que incluye un promotor mínimo (AATAAAT) y un promotor proximal con los sitios TTF1 (por Thyroid Transcription Factor en inglés) y NTF-1 (por NIS TSH responsive Factor-1 en inglés). Además, el promotor de NIS contiene una región denominada NUE (por NIS Upstream Enhancer en inglés) entre los pares de bases -2495 y -2264 (Ohno et al., 1999; Chun et al., 2004; Kogai et al., 2006). La región NUE estimula la transcripción específica de NIS en tiroides de una manera dependiente de AMPc, y está involucrada en los aspectos más importantes de la regulación de NIS. Se ha reportado que la región NUE contiene 2 sitios de unión para el factor de transcripción de tiroides (TTF1), el cual no posee efecto sobre la transcripción de NIS, 2 sitios de unión a Pax-8, y 1 elemento que responde a AMPc degenerado (CRE-L, Chun et al., 2004) (Figura 22).

Por lo tanto, en células tiroideas TSH es capaz de estimular la actividad de NIS a través de la vía de señalización mediada por AMPc (Weiss et al., 1984; Kaminsky et al., 1994; Paire et al., 1997). AMPc activa mecanismos dependientes e independientes de la proteína quinasa A (PKA), incluyendo PKA-CREB, APE/Ref-1-Pax-8, y 2 de las 3 vías de las MAPK, ERK-MAPK y p38-MAPK, incrementando así los niveles de ARNm de NIS (Kogai et al., 2006).

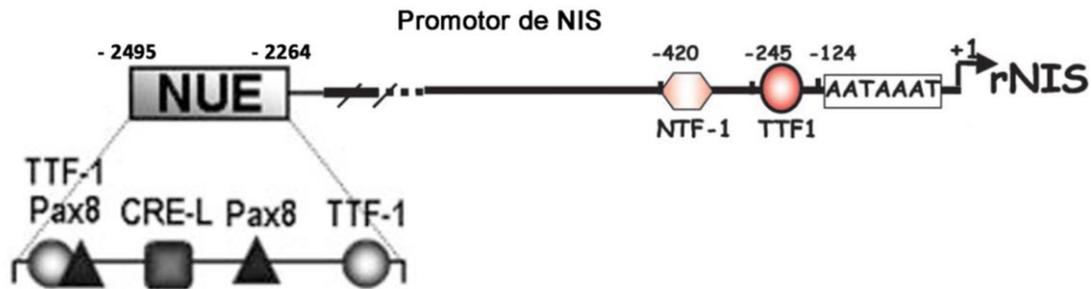


Figura 22: Representación esquemática de la estructura del promotor de NIS de rata

Diagrama del promotor de NIS indicando el principal sitio de inicio de la transcripción (+1), la caja TATA (AATAAAT), el promotor proximal, y la región NUE. El promotor proximal contiene el sitio de unión al factor de transcripción de tiroideas (TTF1), y el elemento respondedor de TSH donde interacciona un factor de transcripción putativo (NTF-1). La región NUE contiene 2 sitios de unión a TTF1, 2 sitios de unión a Pax8, y un elemento respondedor de AMPc degenerado (CRE-L), el cual es importante para una completa transcripción dependiente de TSH-AMPc (modificada de Dohán et al., 2003).

Por otro lado, trabajos previos han reportado que miembros de la superfamilia RAS, también conocidas como pequeñas GTPasas, son mediadores de la expresión de NIS estimulada por TSH en células tiroideas (Pomerance et al., 2000; Tsygankova et al., 2001).

Teniendo en cuenta que Rab1b puede modular la expresión de genes regulando la actividad promotora de los mismos, es posible que en situaciones fisiológicas, donde la secreción está estimulada por factores tróficos, los niveles incrementados de Rab1b puedan modular la expresión de genes necesarios para responder al estímulo secretor.

Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es analizar mecanismos celulares y moleculares involucrados en la respuesta del sistema de transporte de membranas en un modelo de células de secreción regulada.

Objetivo Específico

5. Analizar la implicancia que posee el incremento de los niveles de Rab1b en el proceso de secreción regulada de células secretorias de tiroides (FRTL5).

Resultados

5. Implicancia de niveles incrementados de Rab1b en la secreción regulada de células secretorias de tiroides (FRTL5)

5.1. Efecto de TSH en los niveles de Rab1b

Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los tejidos con alta actividad secretoria como tiroides, próstata y células epiteliales de pulmón, los niveles de ARNm de Rab1b se encuentran de 3 a 10 veces más elevados que en otros órganos (Gurkan et al., 2005). Por otro lado, resultados previos indican que cambios en los niveles de Rab1b inducen la vía de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), que modula la expresión de una gran variedad de genes (Romero et al., 2013). Teniendo en cuenta estos datos, nosotros postulamos que un estímulo apropiado induce un aumento de Rab1b en células secretorias especializadas, que promueve a su vez un incremento del transporte de membranas y la secreción de sustratos específicos.

Para analizar cambios en los niveles de Rab1b y su impacto en un sistema secretorio, se usó como modelo de célula secretoria la línea celular de tiroides de rata (FRTL5), que sintetiza la proteína NIS, entre otras, cuando es estimulada con la hormona TSH (Kogai et al., 1997). Con el fin de analizar si la estimulación con TSH también modifica los niveles de Rab1b y GM130, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (IF) y de citometría de flujo. Las células FRTL5 se crecieron en medio basal (-TSH) durante 24-36 horas, y luego se indujeron con TSH por 24 horas (+TSH). Como control positivo de la estimulación de TSH, se analizaron los niveles de NIS empleando IF, los cuales están incrementados en presencia de TSH. El incremento de NIS se corroboró cuantitativamente a través de citometría de flujo (Figura 23). También se analizaron los niveles de Rab1b y GM130 en respuesta al estímulo con TSH, evidenciando un aumento leve pero significativo, de sus intensidades de fluorescencia media (Figura 23). Estos resultados sugieren que TSH no sólo estimula la síntesis de NIS, sino también de proteínas requeridas para el transporte, como son Rab1b y GM130.

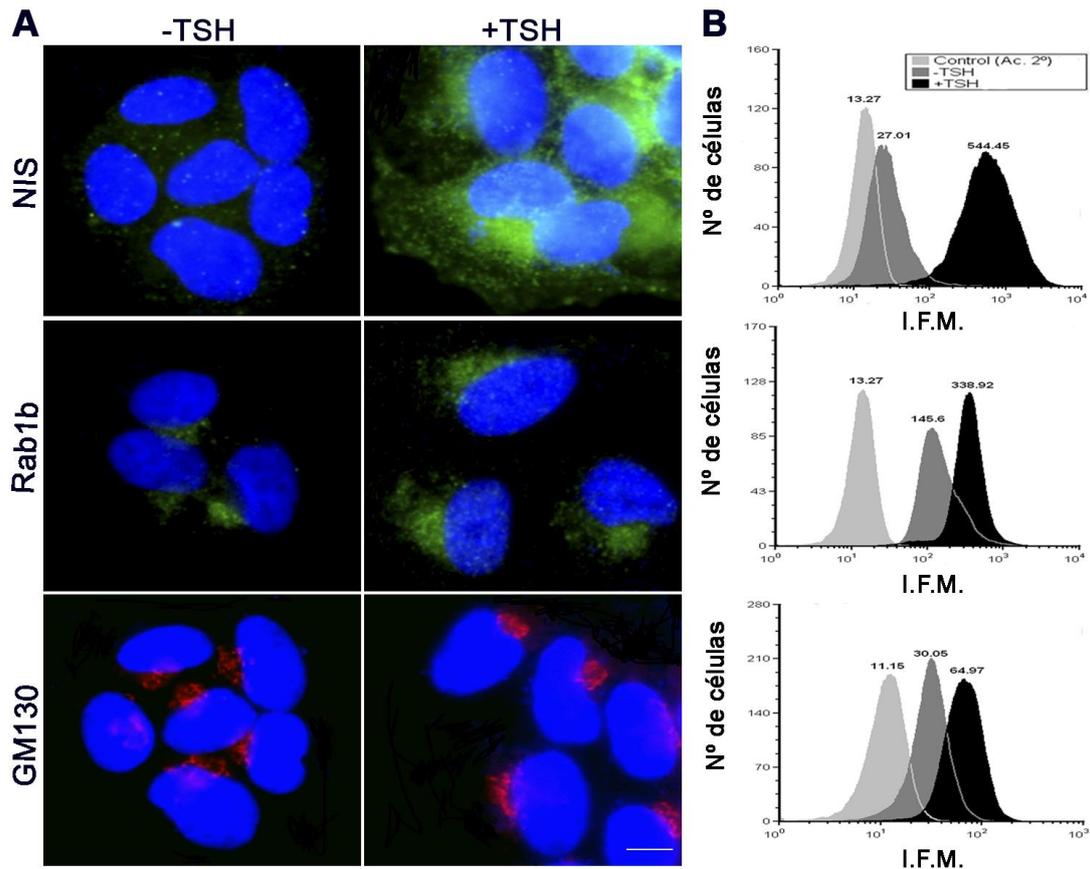


Figura 23: Niveles de NIS, Rab1b y GM130 luego de la estimulación con TSH. Análisis en células FRTL5 de los niveles de las proteínas indicadas, en estado basal (-TSH) o en la condición estimulada (+TSH). (A) Ensayos de IF muestran un incremento en la señal de NIS, Rab1b y GM130 en presencia de TSH. (B) Cuantificación mediante ensayos de citometría de flujo. Los histogramas representan los perfiles en estado basal (-TSH, gris oscuro) o estimulado (+TSH, negro) para las proteínas indicadas en A. Los controles (gris claro) fueron realizados incubando las células sólo con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 647). Los valores de la intensidad de fluorescencia media geométrica (I.F.M.) se indican arriba de cada histograma. Las barras de tamaño representan 10 μ m.

5.2. Efecto de la inhibición de Rab1b en los niveles de NIS

Con el fin de investigar si el incremento de los niveles de Rab1b es necesario para la estimulación de NIS mediada por TSH, se analizó el efecto de la disminución de Rab1b en los niveles de NIS. Para esto, se redujo la expresión de Rab1b empleando ARN de interferencia (siARN). Se transfirió ARN específico de Rab1b para inhibir su expresión en células FRTL5, y una concentración equivalente de siARN sin homología con el ARN de Rab1b, utilizado como control negativo (ver Materiales y Métodos). Se realizaron inmunofluorescencias para evaluar el efecto producido por la depleción de Rab1b (Figura 24), y se confirmó que la transfección con siARN de Rab1b induce una importante disminución en la señal de Rab1b conjuntamente con la desorganización del Golgi, reflejado por la presencia de estructuras punteadas marcadas

con GM130 (Figura 24, A; Monetta et al., 2007). Este patrón punteado de GM130 se utilizó como marcador para identificar las células depletadas de Rab1b después de la transfección del siARN. Se examinó si la inhibición de la expresión de Rab1b fue capaz de bloquear el incremento de GM130 y NIS inducido por la estimulación con TSH (Figura 24, B). Para ello, se transfectaron células FRTL5 con siARN, y luego se incubaron en medio basal (-TSH) durante 36 horas antes de ser estimuladas con TSH. Luego de 24 horas de estimulación con TSH, células control (siARN control negativo) mostraron un incremento de la intensidad de fluorescencia de GM130 y NIS (Figura 24, B). En contraste, en células depletadas de Rab1b, no se observaron cambios significativos en la intensidad de las señales de GM130 y NIS (confirmado por análisis de citometría de flujo; dato no mostrado), indicando que la depleción de los niveles de Rab1b produce el bloqueo del incremento de GM130 y NIS inducido por TSH.

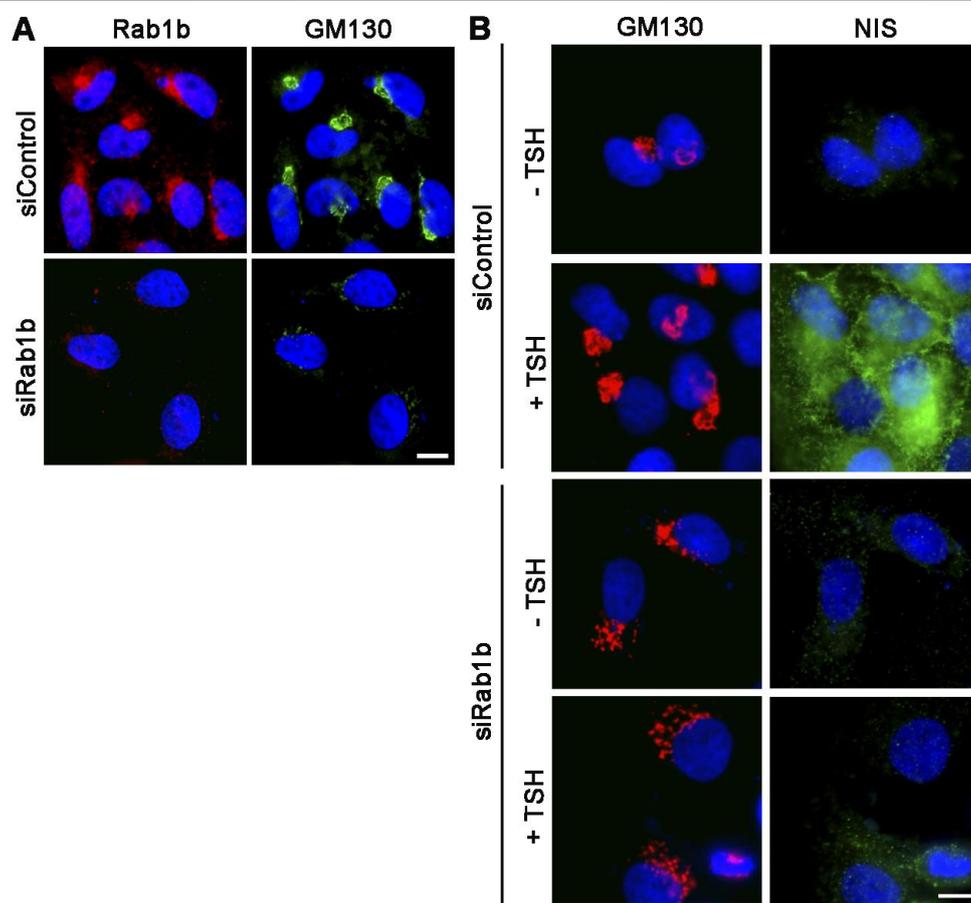


Figura 24: Efecto de la inhibición de Rab1b en los niveles de NIS. Análisis de inmunofluorescencia en células transfectadas con siARN control o específico de Rab1b. (A) Patrones de distribución de Rab1b y GM130 luego de la transfección de siARN en células estimuladas con TSH. (B) Efecto del siARN de Rab1b en condición basal (-TSH) o estimulada (+TSH). La depleción de Rab1b bloquea el incremento de GM130 y NIS inducido por TSH. Las barras de tamaño representan 10 μ m.

5.3. Efecto de Rab1b en la expresión y la actividad promotora de NIS

Si bien la inhibición de Rab1b produce una disminución de los niveles de NIS en respuesta a TSH, se desconoce si este efecto está relacionado a la participación de Rab1b en el transporte intracelular o a una regulación directa de NIS por parte de Rab1b. Para analizar esto, células FRTL5 estimuladas con TSH se trataron con Brefeldina A (BFA) durante distintos tiempos, y fueron procesadas para inmunofluorescencia. BFA bloquea el transporte de membranas promoviendo la redistribución de proteínas del complejo de Golgi al RE o a VTCs, incluyendo a Rab1b, p115 y GM130 que se localizan en estructuras punteadas (Figura 25). Como se muestra en la Figura 25, GM130 se redistribuye a estructuras punteadas pequeñas dispersas a lo largo de la célula luego de 1 y 6 horas de tratamiento con BFA. En esta condición no se visualiza incremento de los niveles de NIS, mientras que a tiempos largos de tratamiento con BFA, los niveles de NIS están incrementados significativamente, lo que sugiere que Rab1b regula los niveles de NIS independientemente de su función reguladora del transporte. Es importante aclarar que frente al tratamiento prolongado con BFA (24 horas), GM130 sigue redistribuida en estructuras punteadas, sin embargo, las mismas se concentran en la región perinuclear similar a lo previamente descrito para p115 (Alvarez and Sztul, 1999).

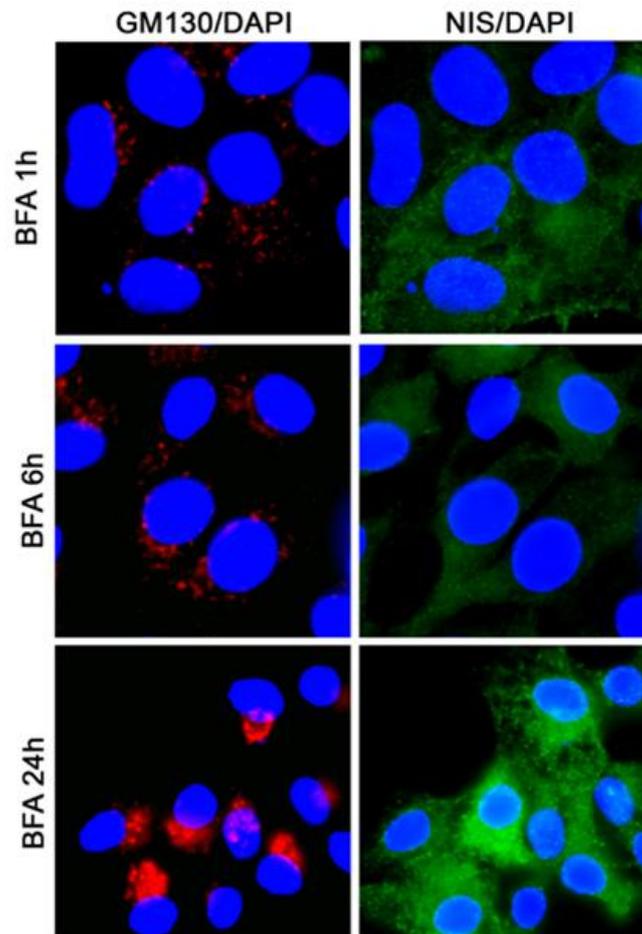


Figura 25: Efecto del bloqueo del transporte sobre los niveles de NIS. Células FRTL5 fueron incubadas en presencia de TSH y BFA (2,5 $\mu\text{g/ml}$) durante los tiempos indicados y analizadas mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos anti-GM130 y anti-NIS.

Teniendo en cuenta que en células FRTL5 el estímulo con TSH es capaz de incrementar los niveles de Rab1b, y que la inhibición de Rab1b impidió el incremento de los niveles de NIS inducidos con TSH, nosotros postulamos que la sobre-expresión de Rab1b debería elevar los niveles de NIS de una manera independiente de TSH. Para demostrar esto, células FRTL5 se transfectaron con GFP-Rab1bwt, y luego de 24 horas se dividieron en 2 placas donde crecieron en presencia de medio completo por 16 horas (+TSH). Luego una de las placas se incubó en medio basal por 48 horas (-TSH), y subsecuentemente se estimuló con TSH por 24 horas. La segunda placa se incubó en medio basal por el mismo período total de tiempo. Con el fin de evaluar el efecto de la sobre-expresión de Rab1b sobre la expresión de NIS en condiciones basales y estimuladas con TSH, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo (Figura 26). Las células transfectadas con GFP-Rab1bwt exhibieron una señal de NIS más alta que células no transfectadas (Figura 26, A), tanto en condición basal como estimulada con

TSH. La cuantificación empleando citometría de flujo indica que la expresión de NIS fue de 1.5 a ~2 veces más alta en células transfectadas que en células no transfectadas tanto en estado basal (-TSH) como estimulado (+TSH) (Figura 26, B). El control realizado en células transfectadas con el vector GFP vacío indica que la expresión de NIS fue similar en células transfectadas y no transfectadas (dato no mostrado).

Teniendo en cuenta que Rab1bwt no sólo modula la expresión de genes sino también la actividad promotora de distintos genes tales como GM130, KDELR, y JUN (Romero et al., 2013), se examinó si niveles elevados de Rab1b podrían modular la actividad promotora de NIS. Así, se evaluaron los efectos de la sobre-expresión de Rab1b sobre la actividad de la región promotora de NIS de rata, que incluye la región NUE (por NIS Upstream Enhancer en inglés). NUE es responsable de los aspectos más importantes en la regulación de NIS, por lo que se co-transfectaron en forma transiente células FRTL5 con un vector reportero de luciferasa, que incluye el sitio NUE (pNUE), un vector control (*Renilla reiniformis* phRL-TK) y GFP-Rab1bwt (ver Materiales y Métodos).

Luego de la transfección, se evaluó la actividad luciferasa de pNUE en condición basal (-TSH) o estimulada (+TSH). Además, se realizaron paralelamente como controles, co-transfecciones similares a las descritas previamente, con un vector GFP vacío o una construcción GFP-Rab1bN121I en lugar de GFP-Rab1bwt. Se seleccionaron células transfectadas con las diferentes construcciones GFP empleando "FACS Cell sorting" para determinar exclusivamente la actividad luciferasa de pNUE en esas células. La actividad relativa de luciferasa del promotor pNUE en condición basal (-TSH) es similar en un contexto de sobre-expresión de GFP, GFP-Rab1bwt, o GFP-Rab1bN121I (Figura 26, C). La inducción con TSH (por 4 horas) estimula la actividad luciferasa de pNUE en células transfectadas con GFP comparada con la condición basal (1.6 veces, de 15.71 a 22.29). Esta estimulación es similar a la reportada previamente para células no transfectadas. De manera interesante, la actividad relativa de luciferasa de pNUE incrementa ~2.3 veces (de 17.17 a 39.19 veces) en células que sobre-expresan Rab1bwt (GFP-Rab1bwt) luego de la inducción con TSH, mientras que la expresión de GFP-Rab1bN121I impide la activación de pNUE inducida con TSH. Además, el efecto de Rab1bwt sobre la actividad promotora de NIS es evidente a tiempos cortos de inducción con TSH (4 horas), mientras que la actividad promotora de NIS es similarmente alta en ambas condiciones posterior a tiempos de inducción prolongados (12-24 horas; dato no mostrado), probablemente como consecuencia de la saturación de la actividad promotora.

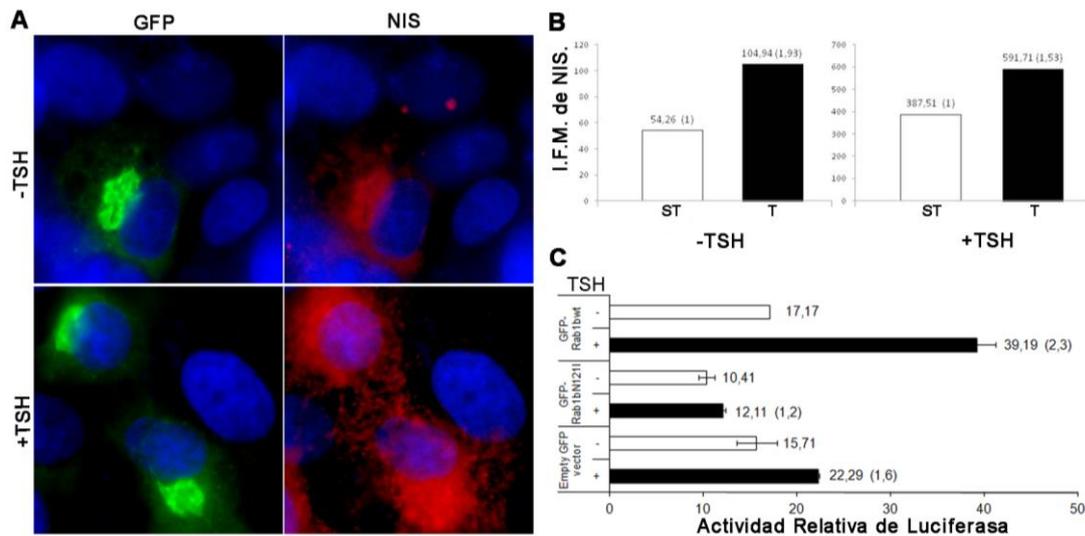


Figura 26: Efecto de Rab1b en la expresión y la actividad promotora de NIS. (A) Análisis de inmunofluorescencia de células FRTL5 que sobre-expresan GFP-Rab1bwt en condición basal (-TSH) o estimulada (+TSH). (B) Gráfico de barras que representa la intensidad de fluorescencia media de NIS (I.F.M.), en células sin transfectar (ST) y transfectadas con GFP-Rab1bwt (T), tanto en estado basal como estimulado con TSH. El valor de I.F.M. para cada condición se indica arriba de cada barra, y entre paréntesis se muestra la relación entre las muestras tomando como 1 la condición sin transfectar. (C) Actividad relativa de luciferasa del promotor de NIS (pNUE) co-transfectado en células FRTL5 con las construcciones GFP indicadas, incubadas en condición basal o estimulada. Los gráficos muestran la actividad relativa de luciferasa, los números indicados a la derecha de cada barra muestran el valor promedio de la actividad luciferasa (n=2), y entre paréntesis se expresa la relación entre muestras para las condiciones indicadas. La sobre-expresión de Rab1b modula positivamente la expresión y la actividad promotora de NIS.

En conjunto, estos resultados indican que vías estimuladas con TSH incrementan la expresión de Rab1b y GM130, las cuales son proteínas que regulan el transporte a largo de la vía secretoria. Además, un incremento de Rab1b modula positivamente la expresión y la actividad promotora de NIS, sugiriendo un rol de Rab1b en la vía de activación de NIS.

Nuestros datos sugieren que la activación de la secreción (o el transporte de membranas) mediante un estímulo secretor induce un incremento de los niveles de Rab1b que desencadena circuitos esenciales de señalamiento para coordinar la adaptación celular requerida para responder al estímulo secretor.

Discusión

Tal como fue descrito previamente, TSH induce la expresión de NIS en células FRTL5 (Chun and Di Lauro, 2001). Además, en este trabajo se encontró que TSH también es capaz de inducir la expresión de Rab1b y GM130 en células FRTL5 (Figura 23). Estos resultados indican que la inducción de la secreción en tejidos tiroideos mediante un estímulo específico, no sólo puede incrementar la expresión de una proteína característica de este tejido, NIS, sino que también aumenta la expresión de proteínas ubicuas que están involucradas en la vía secretoria.

Por otra parte, la inhibición de Rab1b empleando siARN específico, bloquea la expresión de GM130 y NIS inducida por TSH (Figura 24). Este efecto no es debido a la función clásica que cumple Rab1b en transporte ya que no se impide la expresión de NIS cuando se bloquea el mismo en la interfase RE-Golgi, mediante el uso de BFA, la cual impide que Rab1b promueva el reclutamiento de GBF1 (GEF de Arf1) y la consiguiente formación de la cubierta COPI (Figura 25). Estos resultados sugieren que, la expresión y/o inducción de Rab1b son necesarias en células tiroideas para la inducción de NIS dependiente de TSH.

Como bien se conoce, en células tiroideas, la unión de TSH a su receptor, TSHR, provoca la activación de proteínas G heterotriméricas, principalmente $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha q}$, las cuales activan a su vez a las proteínas quinasas A (PKA) y C (PKC), respectivamente. Una vez activada, la PKA fosforila una variedad de proteínas que cambian sus actividades para promover el crecimiento y la diferenciación. El factor de transcripción CREB es el principal blanco de la PKA, y es requerido para la activación de la región NUE del promotor de NIS, el cual incluye un sitio degenerado CRE-L, entre otros sitios de unión (Chen et al., 2004). Curiosamente, el sitio CREB también está presente en el promotor de GM130 y es importante para la regulación de la expresión de GM130 en respuesta al incremento de los niveles de Rab1b (Romero et al., 2013). Existe la posibilidad de que en el promotor de GM130, el sitio de unión a CREB sea necesario para que la vía TSHR/AMPC regule la expresión de GM130. Sin embargo, la inhibición de Rab1b revierte el incremento de GM130 inducido por TSH, sugiriendo fuertemente que la actividad y/o incremento de Rab1b es importante para regular los niveles de GM130 inducidos por TSH.

Además, TSH incrementa la expresión de Rab5 y Rab7, pero no de Rab8, de una manera dependiente de AMPC (Croizet-Berger et al., 2002). Mediante análisis de secuencias se identificó un potencial sitio CRE-L en la secuencia promotora de Rab5a y Rab7 (Croizet-Berger et al., 2002), así como en la secuencia promotora de Rab1b. Para confirmar el rol funcional de estas secuencias en células tiroideas, serán necesarios estudios complementarios.

En este trabajo, se mostró que células FRTL5 transfectadas con GFP-Rab1bwt presentan altos niveles de NIS (Figura 26), mientras que células control transfectadas sólo con GFP no manifiestan el mismo efecto (dato no mostrado). Sin embargo, es importante destacar que se induce mayor expresión de NIS en células estimuladas con TSH, que en aquellas que sobre-expresan Rab1b (Figura 26 B, IFM: 387.51 y 104.94, respectivamente). Este resultado indica que la sobre-expresión de Rab1b, por sí misma, no es capaz de desencadenar una inducción de NIS similar a la que genera TSH, por lo que esta es necesaria aún en presencia de altos niveles de Rab1b. En conjunto, estos resultados indican que Rab1b es necesaria, pero no suficiente, para promover la expresión de NIS.

TSH induce la actividad promotora de NIS tanto en células que sobre-expresan GFP-Rab1bwt como en células control que expresan el vector GFP. El agregado de TSH incrementa la actividad relativa de luciferasa 2.3 veces y 1.6 veces, respectivamente. Estos datos indican que la estimulación con TSH es suficiente para inducir la actividad promotora de NIS, y que TSH induce una alta actividad promotora de NIS tanto en células que sobre-expresan GFP-Rab1bwt como en células control (GFP). Por lo tanto, la sobre-expresión de Rab1b puede incrementar la respuesta del promotor de NIS a TSH.

En células FRTL5, PKA es necesaria para activar p38, la cual regula la expresión de NIS mediada por TSH (Pomerance et al., 2000). Además, PKA fosforila CREB de una manera dependiente de p38. Teniendo en cuenta la suposición de que el incremento de Rab1b es dependiente de AMPc/PKA, nosotros proponemos que, en células FRTL5, Rab1b actúa en una etapa anterior a la fosforilación de p38 y es necesaria para la activación de la expresión de NIS. Alternativamente, podría ocurrir que la cinética de PKA para inducir p38, y esta a su vez a CREB, sea más rápida que la cinética de PKA para promover la expresión de Rab1b. Nuestros resultados muestran, por primera vez, que cambios en los niveles de Rab1b modulan la transcripción de genes, y sugieren fuertemente que el incremento de Rab1b es necesario para generar una respuesta secretoria.

La vía de señalización intracelular activada por un incremento de Rab1b, puede ser comparada con la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, activada por estrés del RE), debido a que ambas desencadenan una respuesta significativa a nivel transcripcional. La activación de la vía UPR promueve selectivamente la transcripción de genes que codifican para proteínas (mayormente chaperonas) que se enfrentan al estrés del RE, mientras que la respuesta inducida por Rab1b, fundamentalmente impacta en genes que codifican para proteínas requeridas para el transporte de membranas o la estructura del Golgi. Por lo tanto, nosotros

postulamos que este mecanismo ayuda a la célula a responder a una demanda elevada de la secreción. Además, recientemente se reportó que KDELR actúa como un receptor de señalización que es capaz de sensar un incremento de proteínas cargo en el RE, y activa una cascada de fosforilación que promueve el tráfico intra-Golgi (Pulvirenti et al., 2008).

Este trabajo demuestra, por primera vez, que variaciones en los niveles de Rab1b participan en una vía de transducción de señales que modula la expresión de genes, y muestra que tanto p38 MAPK como el sitio consenso de unión a CREB, son requeridos para esta función.

Rab1b modula la expresión de numerosos genes a través de una vía de transducción de señales que involucra a p38 MAPK, y esta a su vez regula al factor de transcripción CREB (Romero et al., 2013). En conjunto con nuestros resultados, estos hallazgos sugieren que un estímulo secretor induce un incremento de los niveles de Rab1b que posteriormente desencadena una cascada de señalización esencial para la síntesis de moléculas necesarias para coordinar el flujo del transporte de membranas a lo largo de la vía secretoria.

Futuros estudios se enfocarán en caracterizar las proteínas responsables de regular la respuesta inducida por Rab1b, y dilucidar así los mecanismos involucrados en la regulación del transporte y la adaptación celular luego de un estímulo secretor.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

Construcciones de plásmidos

Los plásmidos pEGFP-Rab1bwt y pEGFP-Rab1bN121I (mutante dominante negativa) que codifican para la proteína de fusión GFP-Rab1b, fueron generados previamente y están descritos detalladamente en (Alvarez et al., 2003). Las construcciones GBF1-E794K-myc y pEGFP-GBF1 fueron gentilmente provistas por la Dra. Elizabeth Sztul (University of Alabama at Birmingham, AL). La proteína Sec24C fue clonada en el vector pEYFP-C1 (BD Biosciences, San Jose, CA), según lo descrito previamente en (Slavin et al., 2011). El plásmido pEGFP-p115 fue generado como se describe previamente en (Brandon et al., 2006). La construcción pmCherry-Rab1b que codifica para la proteína de fusión Cherry-Rab1b, fue subclonada a partir del plásmido pEGFP-Rab1b utilizando las enzimas de restricción BamHI/XbaI (Promega). El plásmido SialT2-CFP fue provisto amablemente por el Dr. Hugo Maccioni (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). El plásmido pGL3 que contiene un fragmento de ADN promotor de NIS de rata (pNUE) fue provisto por el Dr. Roberto di Lauro (Stazione Zoologica “Anton Dohrn”, Nápoli, Italia) y se describe en (Ohno et al., 1999). El plásmido pRL-TK (*Renilla reniformis*, Promega) fue gentilmente cedido por el Dr. Hugo Maccioni (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Anticuerpos utilizados

En el transcurso de esta tesis se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos policlonales anti-GFP y anti-EEA1 (donado por el Dr. Gustavo Chiabrando, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina), y anticuerpo monoclonal anti-GM130 (Abcam, Cambridge, MA). Anticuerpo policlonal anti-GalNAcT2 (Sigma-Aldrich). Anticuerpo monoclonal anti-ERGIC53 (Schweizer et al., 1988) donado por el Dr. Hans-Peter Sauri (University of Basel, Basel, Suiza). Anticuerpo policlonal anti-Rab1b (Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpos monoclonales anti-GBF1 y anti-Sec31 (BD Biosciences, San Jose, CA). Anticuerpo policlonal anti-NIS (Levy et al., 1997) donado por la Dra. Nancy Carrasco (Yale University School of Medicine, USA). Anticuerpos secundarios monoclonales y policlonales para inmunofluorescencias marcados con Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA). Los núcleos de las células se tiñeron con Hoechst 33258 (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA)

Cultivo de líneas celulares

Para llevar a cabo los diferentes experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron dos tipos de células. En los ensayos desarrollados en el capítulo 2 de esta tesis se utilizaron células derivadas de tiroides de rata FRTL-5 (ATCC CRL 8305; Van Heuverswyn et al., 1984). Estas células se crecieron en placas de 100 mm en medio D-MEMF12 (Gibco, Grand Island, NY) alta glucosa complementado con 5% de suero de ternero recién nacido (Gibco, Grand Island, NY), 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 final de penicilina y 50 µg/ml final de estreptomina (PAA, Greiner Bio One). En los ensayos desarrollados en el capítulo 1 de esta tesis se utilizaron células humanas HeLa (<http://www.atcc.org>). Esta línea celular epitelial deriva de un adenocarcinoma de cérvix conteniendo el virus papiloma humano 18 (HPV-18). La línea celular se mantuvo en cultivo en placas de 100 mm en medio D-MEM (Gibco, Grand Island, NY) alta glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA, Greiner Bio One), 50 U/ml final de penicilina y 50 µg/ml final de estreptomina (medio completo, Gibco, Grand Island, NY). Ambas líneas celulares se cultivaron en un incubador apropiado con temperatura constante de 37°C y en presencia de 5% de CO₂.

Transfección de líneas celulares

Para realizar las transfecciones de líneas celulares se utilizó el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Paisley, UK). El protocolo que se llevó a cabo para cada línea celular se resume en los siguientes pasos:

Células FRTL-5

-24 horas antes de la transfección, colocar las células en una placa de multiwell-6 (~2x10⁵/well) conteniendo cubreobjetos de vidrio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) a una confluencia aproximada de 80%.

-30 minutos antes de la transfección, el medio de crecimiento de cada pocillo se reemplaza por 1 ml de Optimem (Gibco, Grand Island, NY) sin suero o antibiótico.

-En tubo eppendorf con 200 µl de Optimem, se agregan los plásmidos de interés, mientras que en otro tubo eppendorf conteniendo 200 µl de Optimem se agrega el reactivo de transfección en una proporción ADNtotal-reactivo 1:3. Incubar por separado 5 minutos a temperatura ambiente.

- Mezclar ambos tubos e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar la mezcla al cultivo celular. Luego de 4-6 horas se remueve la mezcla de transfección, se recogen las células mediante el agregado de 1 ml de tripsina (PAA, Greiner Bio One) y se colocan en dos placas de 100 mm con medio D-MEMF12 completo hasta cumplir 24 horas desde la transfección.
- Cambiar el medio por D-MEMF12 con 0,2% de suero y sin TSH durante 48 horas (deprivación en medio basal).
- Cambiar el medio de una placa por D-MEMF12 con 0,2% de suero y 1 mU/ml de TSH e incubar durante 24 horas (inducción) para ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo, o durante 4 horas para medir actividad promotora. La otra placa (control) se mantiene en presencia del medio basal durante el tiempo total del ensayo.

Células HeLa

- 24 horas antes de la transfección, colocar las células en una placa de multiwell-6 ($\sim 2 \times 10^5$ /well) conteniendo cubreobjetos de vidrio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), o en placas con fondo de vidrio de 35 mm (Warner Instruments, Hamden, CT) a una confluencia aproximada de 70%.
- 30 minutos antes de la transfección, el medio de crecimiento de cada pocillo o placa se reemplaza por 1 ml de Optimem (Gibco, Grand Island, NY) con 100 μ l de suero y sin antibiótico.
- En tubo eppendorf con 200 μ l de Optimem, se agrega 500-1000 ng de cada ADN plasmídico, mientras que en otro tubo eppendorf conteniendo 200 μ l de Optimem se agrega el reactivo de transfección en una proporción ADNtotal-reactivo 1:3. Incubar por separado 5 minutos a temperatura ambiente.
- Mezclar ambos tubos e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar la mezcla al cultivo celular. Luego de 4-6 horas se remueve la mezcla de transfección y se reemplaza por medio normal de crecimiento para ensayos de inmunofluorescencia, o D-MEM sin rojo fenol para ensayos *in vivo*.
- Continuar la incubación hasta cumplir 24 horas desde la transfección.

Células bacterianas

En este trabajo las bacterias fueron utilizadas como herramientas tanto para amplificación y mantenimiento de plásmidos como para expresión de proteínas de fusión. Todos los plásmidos descritos se mantuvieron y amplificaron en bacterias pertenecientes a la cepa *Escherichia Coli* DH5- α .

Preparación de bacterias competentes

En el presente trabajo se utilizó el siguiente protocolo para preparar bacterias competentes:

- Repicar una cepa fresca de bacterias conservadas a -80°C en medio LB-Agar (Luria Bertani-Agar) e incubar toda la noche a 37°C .
- Inocular 5 ml de medio LB con una colonia aislada e incubar toda la noche a 37°C .
- Inocular 100 ml de medio LB con 2 ml del cultivo anterior e incubar hasta $\text{DO}_{600}=0,3-0,6$.
- Centrifugar el cultivo por 5 minutos a 3000 rpm a 4°C (rotor previamente refrigerado).
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con suavidad en 5 ml de medio LB con 10% de PEG, 5% de DMSO, 10 mM de MgCl_2 , 10 mM Mg_2SO_4 , 15% de Glicerol (todo en hielo).
- Fraccionar en alícuotas de 100 μl .
- Congelar en N_2 líquido o aire líquido y guardar a -80°C .

Transformación de bacterias competentes

- Incubar las bacterias competentes por 10 minutos en hielo.
- Agregar ADN 910-100 ng) e incubar 30 minutos en hielo.
- Incubar 1 minuto a 42°C .
- Agregar 900 μl de LB.
- Incubar en agitador a 37°C durante 1 hora.
- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender en 200 μl de LB.
- Plaquear en LB-Agar (con el antibiótico necesario para seleccionar las células transformadas).
- Incubar a 37°C 12-24 horas.

Ensayos de inmuno-fluorescencia (IF)

La técnica de inmunofluorescencia permite observar la localización subcelular de proteínas de interés. Para su observación se utilizó tanto un microscopio de epi-fluorescencia (Nikon Eclipse TE-2000, CIBICI-CONICET), como un microscopio de fluorescencia confocal (Olympus FluoView™ FV1000, Centro de Microscopía Óptica y Confocal de Avanzada, Sistema Nacional de Microscopía).

Protocolo:

- Crecer las células sobre cubreobjetos de vidrio estériles colocados dentro de las placas de cultivo.
- Lavar las células 3 veces con PBS 1X.
- Levantar los cubreobjetos con las células adheridas y colocarlos en una cámara húmeda.

- Fijar las células incubando 10 minutos con para-formaldehído 3% en PBS 1X.
- Incubar 10 minutos con solución 10 mM de NH₄Cl en PBS 1X.
- Lavar 3 veces (3 minutos cada lavado) con PBS 1X.
- Permeabilizar las células incubando 7 minutos con PBS 1X 0,01% Triton X-100.
- Realizar 3 lavados con PBS 1X (2 minutos cada lavado).
- Bloquear durante 5 minutos con 2,5% Goat Serum (Sigma-Aldrich), 0,2% Tween-20 (H5152, Promega, Madison, WI) en PBS 1X.
- Bloquear durante 5 minutos con 0,4% Fish Skin Gelatin (Sigma-Aldrich), 0,2 Tween en PBS 1X.
- Diluir el anticuerpo primario en 0,4% Fish Skin Gelatin (0,2% tween en PBS 1X) e incubar durante 45 minutos a 37°C en cámara húmeda.
- Realizar 3 lavados con 0,2% Tween en PBS 1X (5 minutos cada lavado).
- Bloquear durante 5 minutos con 2,5% Goat Serum, 0,2% Tween en PBS 1X.
- Bloquear durante 5 minutos con 0,4 % Fish Skin Gelatin, 0,2% Tween en PBS 1X.
- Diluir el anticuerpo secundario en 2,5% Goat Serum (0,2% tween en PBS 1X) e incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
- Realizar 3 lavados con 0,2% Tween en PBS 1X (5 minutos cada lavado).
- Montar los vidrios utilizando líquido de montaje (Mowiol, Calbiochem).
- Dejar secar a temperatura ambiente o a 4°C por 12 horas.
- Observar en microscopio de fluorescencia a la longitud de onda apropiada.

Citometría de flujo

La técnica de citometría de flujo permite medir de forma cuantitativa los niveles de proteínas de interés. Para ello, se adquirieron las células empleando el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA, CIBICI-CONICET), y luego se realizó el análisis cuantitativo correspondiente empleando el programa FCS Express V3 (www.denovosoftware.com).

Protocolo:

- Las células FRTL-5 se recogieron con 1 ml de tripsina (PAA, Greiner Bio One). Inactivar la misma con 1 o 2 ml de medio D-MEMF12 y llevar a 10 ml con solución buffer HBSS con 1% de SFB.
- Colocar las células (~2x10⁵/well) en una placa multiwell-96. A partir de esta etapa, mantener la placa siempre en hielo.
- Centrifugar 5 minutos a 2400 rpm. Descartar sobrenadante.
- Lavar 2 veces con HBSS/1% SFB.
- Centrifugar 5 minutos a 2400 rpm y descartar sobrenadante.

- Colocar 50 μ l de solución de fijación/permeabilización (Citofix/Citoperm, BD Biosciences, San Jose, CA) durante 20 minutos a 4°C. Evitar la agregación celular vortexeando previamente al agregado de esta solución.
- Realizar 2 lavados con solución de lavado (Perm/Wash buffer, BD Biosciences, San Jose, CA) de 100 μ l cada uno, teniendo en cuenta que en el primer lavado se agregan 100 μ l a la solución anterior sin descartarla. Después de cada lavado centrifugar durante 10 minutos a 2400 rpm. Descartar sobrenadante.
- Colocar 20 μ l de la dilución del anticuerpo primario preparado en la solución de lavado. Dejar 45 minutos a 4°C.
- Realizar un lavado en 200 μ l de solución de lavado.
- Centrifugar 5 minutos a 2400 rpm. Descartar sobrenadante.
- Colocar 20 μ l de la dilución del anticuerpo secundario preparado en solución de lavado. Dejar 30 minutos a 4°C.
- Realizar un lavado en 200 μ l de HBSS/1% SFB.
- Centrifugar 5 minutos a 2400 rpm. Descartar sobrenadante.
- Diluir las células en HBSS (200 μ l/well) usando los tubos de plástico para citometría, y finalmente adquirir 500.000 células en el citómetro.

Silenciamiento de la expresión de genes por ARN de interferencia

Para los ensayos de silenciamiento se utilizó la técnica de ARN de interferencia que permite disminuir de manera específica la expresión endógena de una proteína. Para ello, las células se transfectaron con ARN cortos específicos (Ambion) dirigidos contra el ARN mensajero que codifica para la proteína de interés. Como control se utilizó ARNc scrambled que no hibrida con ningún gen presente en células de eucariotas superiores (Ambion).

Protocolo:

- 24 horas antes de la transfección, colocar las células en una placa de multiwell-6 ($\sim 2 \times 10^5$ /well) conteniendo cubreobjetos de vidrio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) a una confluencia aproximada de 50-60%.
- 30 minutos antes de la transfección, el medio de crecimiento de cada pocillo se reemplaza por 1 ml de Optimem (Gibco, Grand Island, NY) sin suero o antibiótico.
- En tubo eppendorf con 200 μ l de Optimem, se agrega 100 μ M final del siARN específico para Rab1b (ID 120668; Ambion) o el siARN control (scrambled), mientras que en otro tubo eppendorf conteniendo 200 μ l de Optimem se agrega el reactivo de transfección Silenfect (Bio-

Rad) en una proporción ARNtotal-reactivo 1:3. Incubar por separado 5 minutos a temperatura ambiente.

-Mezclar ambos tubos e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

-Agregar la mezcla al cultivo celular. Luego de 4-6 horas se remueve la mezcla de transfección y se reemplaza por medio D-MEMF12 sin TSH y con 2.5 % de suero, hasta cumplir las 48hs desde la transfección (deprivación en medio basal).

-Cambiar el medio por D-MEMF12 con 2.5% de suero y seguir incubando a 37°C.

-Luego de 24 horas (inducción) procesar las células para ensayos de inmunofluorescencia conjuntamente con células controles tratadas en paralelo en presencia de medio basal durante el tiempo total del ensayo.

Ensayos de gen reportero-Actividad promotora de NIS

Este ensayo permite estudiar la regulación de genes, situando el gen reportero tras el promotor en estudio. Para determinar la actividad promotora de la región 5' regulatoria de NIS se empleó el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Estas regiones se clonaron en el vector pGL3-Basic (Promega), el cual expresa la proteína "firefly luciferase". Esta enzima cataliza la oxidación de la Luciferina a Oxi-luciferina emitiendo luz, la cual puede ser cuantificada con un luminómetro. Cuanto mayor sea la actividad promotora, mayor será la expresión de la proteína "firefly luciferase". Como control interno de viabilidad celular y eficiencia de transfección se empleó el vector pRL-TK (Promega) que expresa constitutivamente la proteína "Renilla luciferase", la cual cataliza la oxidación de la Luciferrina-coelenteraza emitiendo luz.

Protocolo:

-Las transfecciones realizadas para medir la actividad promotora de NIS (pNIS-TK-Luc3 o pGL3-NUE [NIS upstream enhancer]) se realizaron co-transfectando ~500 ng de GFP-Rab1bwt o GFP-Rab1bN121I o GFP-vector vacío; 1 µg del vector pGL3 Basic vacío o pGL3-NUE; y 50 ng del vector pRL-TK (control interno).

-Medir la actividad luciferasa en cada extracto y normalizar respecto a la actividad enzimática expresada por pRL-Tk.

-Luego de la inducción con TSH las células transfectadas con las distintas construcciones GFP (Rab1bwt, Rab1bN121I y GFP vacío) se recogieron y se separaron de las no transfectadas empleando citometría de flujo y FACS cell sorting.

-Las células seleccionadas se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos, se resuspendieron en 50 μ l de agua mili-Q y se lisaron utilizando 50 μ l de reactivo de lisis (1X Passive Lysis Buffer-Promega) incubando por 15 minutos a temperatura ambiente en agitación.

-Se agregó 10 μ l del lisado en una placa de 96 pocillos opaca para medir primero la actividad luciferasa en el luminómetro MLX microtiter® Plate Luminometer (DYNEX), y luego la actividad renilla.

Protocolo de lectura

Se programó el aparato para una inyección de 25 μ l de reactivo quimio-luminiscente en modo FLASH y se integraron las lecturas de 30 y 60 segundos. Los reactivos utilizados fueron Luciferase Assay System (Promega) y Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Una vez obtenidas las actividades de luciferasa, se extrajo la totalidad de reactivo del aparato y se lavó exhaustivamente (15 veces) con agua bidestilada estéril. Posteriormente se adicionó al aparato el reactivo para medir la actividad de renilla “Stop & Glo Reagent” (Promega), que utiliza los mismos pocillos donde se efectuó la lectura de luciferasa. El reactivo Stop & Glo Reagent secuestra los iones Mg^{+2} necesarios para cuantificar la actividad firefly luciferase permitiendo la actividad de la enzima renilla. Para diferenciar la luz emitida por cada reacción se cuantifica primero la actividad luciferasa y posteriormente se agrega un buffer que bloquea la luz emitida por la primera reacción, para luego poder cuantificar la luz emitida por la renilla en forma independiente. Otro reactivo utilizado sin variaciones de los resultados fue el Renilla Luciferase Assay System (Promega) aunque requiere adicionar 10 μ l de lisado en una nueva placa.

Actividad Relativa de Luciferasa de pNUE

Las lecturas obtenidas para las actividades luciferasa se relacionan con la actividad de renilla obtenida para cada punto del ensayo de transfección. Luego se relacionaron los valores de pNUE con respecto al vector vacío pGL3-Basic.

Ensayos de co-localización

Este ensayo permite observar la superposición espacial entre dos marcadores fluorescentes diferentes, para evaluar si las diferentes proteínas están situadas en la misma zona de la célula o muy cerca entre ellas, siendo esto indicativo de una interacción biológica. Para ello, se utilizó un microscopio de fluorescencia confocal (Olympus FluoView™ FV1000, Centro de Microscopía Óptica y Confocal de Avanzada, Sistema Nacional de Microscopía), y se analizó la correlación entre ambas proteínas, mediante el coeficiente de correlación de Pearson (PCC), el cual es una

medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas, y representa el grado de solapamiento entre las imágenes. Los ensayos de co-localización se componen de tres etapas descritas a continuación:

Adquisición de imágenes

Las imágenes se capturaron con un objetivo de 60x apocromático (apertura numérica 1,42; z-stack 130 nm) y se procesaron con Adobe Photoshop CC para la presentación. Para el análisis de GFP, la excitación se realizó con un láser de argón a 488 nm y la fluorescencia de emisión se recuperó a 500-530 nm. Para el análisis de Cherry, la excitación se realizó a 543 nm y la fluorescencia de emisión se recuperó a 550-620 nm.

Procesamiento de imágenes

Las imágenes se procesan con una técnica llamada deconvolución, la cual permite, mediante distintos procedimientos matemáticos, mejorar la claridad y la interpretación de las imágenes. Para ello, se utiliza el programa Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>, Biomedical Imaging Group, EPFL, Suiza) y se deben seguir los siguientes pasos:

- Emplear el plugin “PSF generator” que permite generar y visualizar una imagen tridimensional llamada función de dispersión del punto (por PSF, Point Spread Function en inglés; Kirshner et al., 2013).
- Aplicar el modelo vectorial para generar la imagen PSF (Aguet, 2009; Richards and Wolf, 1959).
- Configurar los parámetros ópticos (apertura numérica 1,42; índice de refracción 1,515; resolución lateral 50 nm y axial 130 nm; y longitud de onda 488 o 594 dependiendo del plásmido transfectado).
- Configurar los parámetros de los “stacks” (tamaño NX=1024/NY=1024/NZ=variable).
- Luego de generar la imagen PSF, se utiliza otro “plugin” del programa Fiji llamado “DeconvolutionLab” para llevar a cabo la deconvolución final de la imagen.
- Elegir el algoritmo Tikhonov-Miller y especificar el parámetro de regularización (0,05) y el número de iteraciones (15).

Análisis cuantitativo

- Abrir las imágenes deconvolucionadas de cada proteína, por separado, para cuantificar la co-localización entre ambas.
- Seleccionar una región de interés (ROI, por Region of Interest en inglés) en cada canal que incluya toda la célula.

-Emplear el “plugin” Coloc 2 del programa Fiji, que permite determinar la correlación de la intensidad de un pixel de ambas proteínas.

-Elegir el algoritmo “Mander’s Correlation” para poder calcular el PCC, el cual es un índice cuyos valores absolutos oscilan entre 0 y 1. Cuanto más cerca de 1 mayor es la correlación, y menor, cuanto más cerca de cero.

Para cuantificar el tiempo de co-localización, se tomaron las imágenes de los “Time-lapse” (ver más adelante) correspondientes a cada condición analizada y se eligieron aquellas estructuras que poseen ambos marcadores co-localizando. Luego se midió el tiempo en el cual están asociados los mismos y se graficaron dichos tiempos para cada estructura analizada.

Ensayos de microscopía *in vivo*

Para los ensayos de microscopía *in vivo*, las células se crecieron en placas con fondo de vidrio (WillCo-dish, Warner Instruments, Hamden, CT) en medio D-MEM con rojo fenol y 10% de SFB para desarrollar los ensayos de recuperación de la fluorescencia luego del foto-blanqueado (FRAP). Para llevar a cabo ensayos de “Time-lapse”, las células se crecieron en D-MEM sin rojo fenol y 10% de SFB ya que este medio evita el foto-blanqueado que se genera cuando se toman imágenes durante tiempos largos.

Ensayos de FRAP

Durante el ensayo las células se mantuvieron a 37°C, y en presencia de 5% de CO₂, en un incubador (INU, Tokai Hit, Japan) con un controlador de la temperatura (Tritech DigiTherm temperature controller, CA, U.S.A.).

Para los ensayos de FRAP se utilizó un microscopio de fluorescencia confocal (Olympus FluoView™ FV1000, Centro de Microscopía Óptica y Confocal de Avanzada, Sistema Nacional de Microscopía), y se tomaron dos imágenes iniciales a 0,05% de intensidad del láser. Luego, la ROI se foto-blanqueó mediante exposición durante 15 segundos al 100% de intensidad del láser. Posteriormente, la recuperación de la fluorescencia en la ROI se monitoreó tomando imágenes al 10% de intensidad del láser cada 10 segundos durante 3-6 minutos. La intensidad promedio de la ROI y de regiones de referencia (ROR) se midió utilizando el programa Fiji (<http://fiji.sc/Fiji>). Luego se utilizó el programa Microsoft Excel (Microsoft) para graficar el porcentaje de recuperación de la fluorescencia en el tiempo de acuerdo a la siguiente fórmula: $F(t) = (F_{ROI}/F_{ROR}) / (F_{preROI}/F_{preROR}) \times 100$, donde F_{preROR} es la intensidad de fluorescencia de ROR antes del foto-blanqueado, F_{ROR} es la intensidad de fluorescencia de ROR al tiempo t , F_{preROI} representa la intensidad de ROI antes del foto-blanqueado, y F_{ROI} es la intensidad de

fluorescencia de ROI al tiempo t . El número de células evaluadas en cada ensayo está indicado por la letra n .

Ensayos de “Time-lapse”

Para los ensayos de “Time-lapse” se utilizó un microscopio de fluorescencia confocal (IX81, Olympus, Centro de Microscopía Óptica y Confocal de Avanzada, Sistema Nacional de Microscopía), con un objetivo PLAPON 60x (apertura numérica 1,42) y equipado con una unidad de disco giratorio (por DSU, Disk Spinning Unit en inglés, Japón, Olympus). En los ensayos de doble o triple marca, las imágenes de los distintos fluoróforos analizados fueron tomadas secuencialmente en cada tiempo, lo que implica que cada fluoróforo tiene un tiempo de exposición (que varía entre 0,5 y 1 segundo dependiendo de los niveles de expresión de cada construcción en las diferentes células analizadas). Si bien en la adquisición de las imágenes de la doble o triple marca se produce un desfase, se considera que las imágenes de los distintos fluoróforos tomadas a un determinado tiempo son simultáneas.

Las imágenes correspondientes a la doble expresión de los plásmidos Cherry-Rab1b y YFP-Sec24, fueron tomadas secuencialmente cada 4 segundos durante un tiempo total de 10 minutos, utilizando una cámara Orca ER (Hamamatsu, USA) bajo el programa control cell[®] (Olympus). Las imágenes correspondientes a la doble expresión de los plásmidos Cherry-Rab1b y GFP-p115, fueron tomadas secuencialmente cada 6 segundos durante un tiempo total de 6 minutos. Las imágenes correspondientes a la triple expresión de los plásmidos Cherry-Rab1b, YFP-Sec24 y SialT2-CFP, fueron tomadas secuencialmente cada 30 segundos durante un tiempo total de 30 minutos.

Durante el ensayo las células se mantuvieron a 37°C en una cámara de incubación (Harvard Instruments).

Tratamiento con Brefeldina A (BFA) y lavado de BFA

Para ensayos de inmunofluorescencia, las células HeLa se cultivaron en medio D-MEM con 10% de SFB y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BFA (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C. Para llevar a cabo ensayos de lavado de la BFA, se remueve el medio con BFA y se reemplaza por medio normal de crecimiento. Luego, se incuba durante 20, 40 y 60 segundos a 37°C.

Para ensayos *in vivo*, las células se trataron con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BFA durante 2 horas a 37°C con excepción de ensayos de lavado de BFA donde se trataron las células con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BFA durante 2 horas a 37°C. En los ensayos de “Time-lapse” de triple marca, se comienzan a tomar las imágenes luego de 10 minutos (lavado temprano) o de 30 minutos (lavado tardío) de efectuado el lavado de la BFA.

Tratamiento con Nocodazol (NOC)

Este tratamiento sólo se llevó a cabo en los ensayos de FRAP. Las células HeLa se cultivaron en medio D-MEM con 10% SFB y luego se les agregó 2,5 µg/ml de NOC durante 2 horas a 37°C.

Análisis cuantitativo de la relación espacio/temporal entre Rab1b y el cargo

-Abrir las imágenes de “Time-lapse” con el programa Fiji, y elegir estructuras COPII que permanecen estables por 10 minutos o más.

-Emplear la herramienta “ROI manager” del programa Fiji para seleccionar un área circular aproximadamente el doble o triple de tamaño de la estructura de interés.

-Medir en el tiempo indicado anteriormente la intensidad media de fluorescencia del pixel (IFP), y su correspondiente desviación estándar, para Rab1b y el cargo.

-Calcular la varianza para Rab1b y el cargo utilizando el cuadrado de la desviación estándar (Varianza de la IFP).

-Normalizar los valores de varianza dividiendo todos los valores con respecto al tiempo inicial ($t=0$) y de esta manera obtener los valores relativos de Varianza de la IFP para cada proteína.

-Finalmente, para evitar errores en la interpretación de estos valores a causa del enfoque/desenfoque de las estructuras analizadas, se relativizan los valores de varianza para Rab1b y el cargo con respecto a la IFP correspondiente a COPII, que es tomada como referencia del plano focal.

Análisis estadístico de los datos

Los valores obtenidos en los ensayos de co-localización se presentaron como datos paramétricos mediante el promedio del PCC \pm la desviación estándar (DE). La significancia estadística, es decir que la diferencia encontrada entre los grupos no sea producto del azar, fue determinada empleando el test-t Student con la aplicación GraphPad Prism versión 5.0 (<http://www.graphpad.com>). Los valores obtenidos en los ensayos de tiempo de co-localización se presentaron como datos no paramétricos utilizando la mediana del tiempo y los rangos intercuartiles (Percentilos 25% y 75%). La significancia estadística fue determinada empleando el test de ANOVA de una vía seguido por el método de comparación múltiple de Dunn's con el programa GraphPad Prism versión 5.0. La significancia estadística para ambos métodos estadísticos se definió como $p \leq 0,05$.

Abreviaturas

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AMPc: Adenosin Monofosfato cíclico

Arf: ADP-ribosylation factor

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNc: ARN cortos

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

BFA: Brefeldina A

CFP: Cyan Fluorescent Protein

COPI: Coat Protein I

COPII: Coat Protein II

CREB: cAMP Response Element Binding Protein

DE: Desviación Estándar

DAG: diacilglicerol

DIT: diiodotirosinas

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DSU: Disk Spinning Unit

DUOX2: tiroxidasas

EEA1: Early Endosome Antigen 1

ERES: ER Exit Sites

ERGIC: ER-Golgi Intermediate Compartment

FACS Cell Sorting: Separación celular asociada a citometría de flujo

FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching

FRTL5: Fischer Rat Thyroid cell Line

GalNAcT2: N-acetylgalactosaminyltransferase 2

GalT: Galactosyl Transferase II

GAP: GTPase Activating Protein

GBF1: Golgi-specific BFA resistant Factor 1

GDF: GDI Dissociation Factor

GDI: GDP Dissociation Inhibitor

GDP: Guanosin Diphosphate

GEF: Guanine-nucleotide Exchange Factor

GFP: Green Fluorescent Protein

GGT II: Geranyl-Geranyl Transferasa II

- GM130:** Golgi Matrix protein 130
- GMPc:** Guanosin Monofosfato cíclico
- GTP:** Guanosine Triphosphate
- HBSS:** Hank's Buffered Salt Solution
- HT:** Hormonas Tiroideas
- IF:** Inmuno-fluorescencia
- IFP:** Intensity Fluorescence of Pixels
- IP3:** inositoltrifosfato
- MAPK:** Mitogen Activated Protein Kinase
- MIT:** monoyodotirosinas
- MOC:** Mander's Overlap Coefficient
- NADPH:** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
- NIS:** Sodium-Iodide Symporter
- NOC:** Nocodazol
- NTF-1:** NIS TSH responsive Factor-1
- NUE:** NIS Upstream Enhancer
- PBS:** Phosphate-Buffered Saline
- PCC:** Pearson's Correlation Coefficient
- PDS:** Pendrina
- PIP3:** fosfatidilinositoltrifosfato
- PSF:** Point Spread Function (Función de dispersion de punto)
- Rab:** Ras-like in rat brain
- RE:** Retículo Endoplásmico
- REP:** Rab Escort Protein
- RER:** Retículo Endoplásmico Rugoso
- ROI:** Region of Interest
- SE:** Sistema de Endomembranas
- SFB:** Suero Fetal Bovino
- SialT2:** GM3 sialyltransferase 2
- Si ARN:** ARN de silenciamiento
- SNARE:** Soluble NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) Association Protein Receptor
- SRP:** Signal Recognition Particle
- SVC:** Sistema Vacuolar Citoplasmático
- T_{1/2}:** Tiempo medio de recuperación de la fluorescencia
- Tg:** tiroglobulina

TGN: Trans Golgi Network

TPO: Tiroperoxidasa

TRAPP: Transport Protein Particle

TRH: Thyrotropin Releasing Hormone

TSH: Thyroid-Stimulating Hormone

TTF1: Thyroid Transcription Factor

UPR: Unfolded Protein Response

VarIFP: Variance of Intensity Fluorescence of Pixels

VSV-G: Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein

VTC: Vesicular Tubular Cluster

wt: wild type

YFP: Yellow Fluorescent Protein

ypt: yeast protein transport

Bibliografía

Bibliografía

- Adler, J., and I. Parmryd. 2010. Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 77:733-742.
- Aguet, F. 2009. Super-resolution fluorescence microscopy based on physical models. EPFL.
- Aivazian, D., R.L. Serrano, and S. Pfeffer. 2006. TIP47 is a key effector for Rab9 localization. *The Journal of cell biology*. 173:917-926.
- Alberts B , B.D., Lewis J , Raff M , Roberts K , Watson J D 2010. Biología molecular de La Célula. 1602.
- Alexandrov, K., H. Horiuchi, O. Steele-Mortimer, M.C. Seabra, and M. Zerial. 1994. Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *The EMBO journal*. 13:5262-5273.
- Ali, B.R., C. Wasmeier, L. Lamoreux, M. Strom, and M.C. Seabra. 2004. Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *Journal of cell science*. 117:6401-6412.
- Altan-Bonnet, N., R. Sougrat, and J. Lippincott-Schwartz. 2004. Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Current opinion in cell biology*. 16:364-372.
- Alvarez C, G.-M.R., Brandon E, Sztul E. 2003. COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 14:2116-2127.
- Alvarez, C., R. Garcia-Mata, E. Brandon, and E. Sztul. 2003. COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism. *Molecular biology of the cell*. 14:2116-2127.
- Alvarez, C., and E.S. Sztul. 1999. Brefeldin A (BFA) disrupts the organization of the microtubule and the actin cytoskeletons. *European journal of cell biology*. 78:1-14.
- Allan, B.B., B.D. Moyer, and W.E. Balch. 2000. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science (New York, N.Y.)*. 289:444-448.
- Ambesi-Impiombato, F.S., L.A. Parks, and H.G. Coon. 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.
- Anant, J.S., L. Desnoyers, M. Machius, B. Demeler, J.C. Hansen, K.D. Westover, J. Deisenhofer, and M.C. Seabra. 1998. Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex. *Biochemistry*. 37:12559-12568.
- Ang, S.F., and H. Folsch. 2012. The role of secretory and endocytic pathways in the maintenance of cell polarity. *Essays in biochemistry*. 53:29-39.
- Aridor, M., S.I. Bannykh, T. Rowe, and W.E. Balch. 1995. Sequential coupling between COPII and COPI vesicle coats in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *The Journal of cell biology*. 131:875-893.
- Bannykh, S.I., and W.E. Balch. 1997. Membrane dynamics at the endoplasmic reticulum-Golgi interface. *The Journal of cell biology*. 138:1-4.
- Bannykh, S.I., T. Rowe, and W.E. Balch. 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *The Journal of cell biology*. 135:19-35.
- Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M.F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. 1994. COPII: a membrane coat formed by

- Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*. 77:895-907.
- Barlowe, C., and R. Schekman. 1993. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature*. 365:347-349.
- Barlowe, C.K., and E.A. Miller. 2013. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*. 193:383-410.
- Barrowman, J., D. Bhandari, K. Reinisch, and S. Ferro-Novick. 2010. TRAPP complexes in membrane traffic: convergence through a common Rab. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:759-763.
- Beck, R., S. Prinz, P. Diestelkotter-Bachert, S. Rohling, F. Adolf, K. Hoehner, S. Welsch, P. Ronchi, B. Brugger, J.A. Briggs, and F. Wieland. 2011. Coatamer and dimeric ADP ribosylation factor 1 promote distinct steps in membrane scission. *The Journal of cell biology*. 194:765-777.
- Beck, R., M. Rawet, F.T. Wieland, and D. Cassel. 2009. The COPI system: molecular mechanisms and function. *FEBS letters*. 583:2701-2709.
- Ben-Tekaya, H., K. Miura, R. Pepperkok, and H.P. Hauri. 2005. Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *Journal of cell science*. 118:357-367.
- Bethune, J., F. Wieland, and J. Moelleken. 2006. COPI-mediated transport. *The Journal of membrane biology*. 211:65-79.
- Bhattacharya, N., O.D. J, and S.M. Stagg. 2012. The structure of the Sec13/31 COPII cage bound to Sec23. *Journal of molecular biology*. 420:324-334.
- Bhuin, T., and J.K. Roy. 2014. Rab proteins: the key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental cell research*. 328:1-19.
- Blobel, G., and B. Dobberstein. 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*. 67:835-851.
- Blumer, J., J. Rey, L. Dehmelt, T. Mazel, Y.W. Wu, P. Bastiaens, R.S. Goody, and A. Itzen. 2013. RabGEFs are a major determinant for specific Rab membrane targeting. *The Journal of cell biology*. 200:287-300.
- Bonifacino, J.S., and B.S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*. 116:153-166.
- Bonifacino JS, L.-S.J. 2003. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:409-414.
- Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 129:865-877.
- Brandon, E., T. Szul, C. Alvarez, R. Grabski, R. Benjamin, R. Kawai, and E. Sztul. 2006. On and off membrane dynamics of the endoplasmic reticulum-golgi tethering factor p115 in vivo. *Molecular biology of the cell*. 17:2996-3008.
- Bucci, C., and M. Chiariello. 2006. Signal transduction gRABs attention. *Cellular signalling*. 18:1-8.
- Cai, Y., H.F. Chin, D. Lazarova, S. Menon, C. Fu, H. Cai, A. Scalfani, D.W. Rodgers, E.M. De La Cruz, S. Ferro-Novick, and K.M. Reinisch. 2008. The structural basis for activation of the Rab Ypt1p by the TRAPP membrane-tethering complexes. *Cell*. 133:1202-1213.

- Cao, X., N. Ballew, and C. Barlowe. 1998. Initial docking of ER-derived vesicles requires Uso1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *The EMBO journal*. 17:2156-2165.
- Carrasco, N., J. Caton-Williams, G. Brandt, S. Wang, and Z. Huang. 2005. Efficient enzymatic synthesis of phosphoroselenoate RNA by using adenosine 5'-(alpha-P-seleno)triphosphate. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 45:94-97.
- Collins, R.N. 2003. "Getting it on"--GDI displacement and small GTPase membrane recruitment. *Molecular cell*. 12:1064-1066.
- Connerly, P.L., M. Esaki, E.A. Montegna, D.E. Strongin, S. Levi, J. Soderholm, and B.S. Glick. 2005. Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Current biology : CB*. 15:1439-1447.
- Copic, A., C.F. Latham, M.A. Horlbeck, J.G. D'Arcangelo, and E.A. Miller. 2012. ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p. *Science (New York, N.Y.)*. 335:1359-1362.
- Craighead, M.W., S. Bowden, R. Watson, and J. Armstrong. 1993. Function of the ypt2 gene in the exocytic pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell*. 4:1069-1076.
- Croizet-Berger, K., C. Daumerie, M. Couvreur, P.J. Courtoy, and M.F. van den Hove. 2002. The endocytic catalysts, Rab5a and Rab7, are tandem regulators of thyroid hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99:8277-8282.
- Cubitt, A.B., R. Heim, S.R. Adams, A.E. Boyd, L.A. Gross, and R.Y. Tsien. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in biochemical sciences*. 20:448-455.
- Cuif, M.H., F. Possmayer, H. Zander, N. Bordes, F. Jollivet, A. Couedel-Courteille, I. Janoueix-Lerosey, G. Langsley, M. Bornens, and B. Goud. 1999. Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *The EMBO journal*. 18:1772-1782.
- Chavrier, P., J.P. Gorvel, E. Stelzer, K. Simons, J. Gruenberg, and M. Zerial. 1991. Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature*. 353:769-772.
- Cheng, K.W., J.P. Lahad, W.L. Kuo, A. Lapuk, K. Yamada, N. Auersperg, J. Liu, K. Smith-McCune, K.H. Lu, D. Fishman, J.W. Gray, and G.B. Mills. 2004. The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nature medicine*. 10:1251-1256.
- Cherfils, J., and P. Melancon. 2005. On the action of Brefeldin A on Sec7-stimulated membrane-recruitment and GDP/GTP exchange of Arf proteins. *Biochemical Society transactions*. 33:635-638.
- Chun, J.T., V. Di Dato, B. D'Andrea, M. Zannini, and R. Di Lauro. 2004. The CRE-like element inside the 5'-upstream region of the rat sodium/iodide symporter gene interacts with diverse classes of b-Zip molecules that regulate transcriptional activities through strong synergy with Pax-8. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 18:2817-2829.
- Chun, J.T., and R. Di Lauro. 2001. Characterization of the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 109:23-26.

- D'Souza-Schorey, C., and P. Chavrier. 2006. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:347-358.
- Danson, C., E. Brown, O.J. Hemmings, I.J. McGough, S. Yarwood, K.J. Heesom, J.G. Carlton, J. Martin-Serrano, M.T. May, P. Verkade, and P.J. Cullen. 2013. SNX15 links clathrin endocytosis to the PtdIns3P early endosome independently of the APPL1 endosome. *Journal of cell science*. 126:4885-4899.
- De Matteis, M.A., A. Luna, G. Di Tullio, D. Corda, J.W. Kok, A. Luini, and G. Egea. 1999. PDMP blocks the BFA-induced ADP-ribosylation of BARS-50 in isolated Golgi membranes. *FEBS letters*. 459:310-312.
- Der, C.J., and W.E. Balch. 2000. GTPase traffic control. *Nature*. 405:749, 751-742.
- Desnoyers, L., J.S. Anant, and M.C. Seabra. 1996. Geranylgeranylation of Rab proteins. *Biochemical Society transactions*. 24:699-703.
- Di Fiore, P.P., and P. De Camilli. 2001. Endocytosis and signaling. an inseparable partnership. *Cell*. 106:1-4.
- Diao, A., L. Frost, Y. Morohashi, and M. Lowe. 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.
- Dohan, O., A. De la Vieja, V. Paroder, C. Riedel, M. Artani, M. Reed, C.S. Ginter, and N. Carrasco. 2003. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocrine reviews*. 24:48-77.
- Donaldson, J.G., D. Cassel, R.A. Kahn, and R.D. Klausner. 1992. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89:6408-6412.
- Dukhovny, A., A. Papadopoulos, and K. Hirschberg. 2008. Quantitative live-cell analysis of microtubule-uncoupled cargo-protein sorting in the ER. *Journal of cell science*. 121:865-876.
- Ellgaard, L., M. Molinari, and A. Helenius. 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science (New York, N.Y.)*. 286:1882-1888.
- Faini, M., R. Beck, F.T. Wieland, and J.A. Briggs. 2013. Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends in cell biology*. 23:279-288.
- Faini, M., S. Prinz, R. Beck, M. Schorb, J.D. Riches, K. Bacia, B. Brugger, F.T. Wieland, and J.A. Briggs. 2012. The structures of COPI-coated vesicles reveal alternate coatomer conformations and interactions. *Science (New York, N.Y.)*. 336:1451-1454.
- Farhan H, R.C. 2011. Signalling to and from the secretory pathway. *J Cell Sci*. 124:171-180.
- Farquhar, M.G., and G.E. Palade. 1998. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends in cell biology*. 8:2-10.
- Feig, L.A., and G.M. Cooper. 1988. Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Molecular and cellular biology*. 8:3235-3243.
- Forster, R., M. Weiss, T. Zimmermann, E.G. Reynaud, F. Verissimo, D.J. Stephens, and R. Pepperkok. 2006. Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites. *Current biology : CB*. 16:173-179.
- Fujiwara, T., K. Oda, S. Yokota, A. Takatsuki, and Y. Ikehara. 1988. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 263:18545-18552.

- García-Mata, R., T. Szul, C. Alvarez, and E. Sztul. 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.
- Garrett, M.D., J.E. Zahner, C.M. Cheney, and P.J. Novick. 1994. GDI1 encodes a GDP dissociation inhibitor that plays an essential role in the yeast secretory pathway. *The EMBO journal*. 13:1718-1728.
- Gerondopoulos, A., L. Langemeyer, J.R. Liang, A. Linford, and F.A. Barr. 2012. BLOC-3 mutated in Hermansky-Pudlak syndrome is a Rab32/38 guanine nucleotide exchange factor. *Current biology : CB*. 22:2135-2139.
- Gil Hernández A., S.F. 2005. Tratado de nutrición: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. A. Médica, editor. 4500.
- Giraudou, C.G., and H.J. Maccioni. 2003. Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Molecular biology of the cell*. 14:3753-3766.
- Glick, B.S., and A. Nakano. 2009. Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annual review of cell and developmental biology*. 25:113-132.
- Goud, B., A. Zahraoui, A. Tavitian, and J. Saraste. 1990. Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature*. 345:553-556.
- Graham, T.R., P.A. Scott, and S.D. Emr. 1993. Brefeldin A reversibly blocks early but not late protein transport steps in the yeast secretory pathway. *The EMBO journal*. 12:869-877.
- Grosshans, B.L., D. Ortiz, and P. Novick. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:11821-11827.
- Guo, Y., and A.D. Linstedt. 2013. 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., V. Punj, D. Sengupta, and A.D. Linstedt. 2008. Coat-tether interaction in Golgi organization. *Molecular biology of the cell*. 19:2830-2843.
- Gurkan, C., H. Lapp, C. Alory, A.I. Su, J.B. Hogenesch, and W.E. Balch. 2005. Large-scale profiling of Rab GTPase trafficking networks: the membrane. *Molecular biology of the cell*. 16:3847-3864.
- Haas, A.K., S. Yoshimura, D.J. Stephens, C. Preisinger, E. Fuchs, and F.A. Barr. 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.
- Hammond, A.T., and B.S. Glick. 2000. Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Molecular biology of the cell*. 11:3013-3030.
- Hammond, C., and A. Helenius. 1995. Quality control in the secretory pathway. *Current opinion in cell biology*. 7:523-529.
- Haubruck, H., R. Prange, C. Vorgias, and D. Gallwitz. 1989. The ras-related mouse ypt1 protein can functionally replace the YPT1 gene product in yeast. *The EMBO journal*. 8:1427-1432.
- Hauri, H.P., F. Kappeler, H. Andersson, and C. Appenzeller. 2000. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. *Journal of cell science*. 113 (Pt 4):587-596.
- Helms, J.B., and J.E. Rothman. 1992. Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*. 360:352-354.

- Hong, W. 2005. SNAREs and traffic. *Biochimica et biophysica acta*. 1744:120-144.
- Hughes, H., A. Budnik, K. Schmidt, K.J. Palmer, J. Mantell, C. Noakes, A. Johnson, D.A. Carter, P. Verkade, P. Watson, and D.J. Stephens. 2009. Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *Journal of cell science*. 122:2924-2934.
- Hughes, H., and D.J. Stephens. 2008. Assembly, organization, and function of the COPII coat. *Histochemistry and cell biology*. 129:129-151.
- Hutagalung, A.H., and P.J. Novick. 2011. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews*. 91:119-149.
- Jackson, L.P., D. Kummel, K.M. Reinisch, and D.J. Owen. 2012. Structures and mechanisms of vesicle coat components and multisubunit tethering complexes. *Current opinion in cell biology*. 24:475-483.
- Jones, S., C. Newman, F. Liu, and N. Segev. 2000. The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Molecular biology of the cell*. 11:4403-4411.
- Kaiser, C.A., and R. Schekman. 1990. Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell*. 61:723-733.
- Kaminsky, S.M., O. Levy, C. Salvador, G. Dai, and N. Carrasco. 1994. Na(+)-I- symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I(-)-transporting cultured thyroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:3789-3793.
- Kawamoto, K., Y. Yoshida, H. Tamaki, S. Torii, C. Shinotsuka, S. Yamashina, and K. Nakayama. 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 (Copenhagen, Denmark)*. 3:483-495.
- Kirchhausen, T. 2000. Three ways to make a vesicle. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 1:187-198.
- Kirk, S.J., and T.H. Ward. 2007. COPII under the microscope. *Seminars in cell & developmental biology*. 18:435-447.
- Kirshner, H., F. Aguet, D. Sage, and M. Unser. 2013. 3-D PSF fitting for fluorescence microscopy: implementation and localization application. *Journal of microscopy*. 249:13-25.
- Klausner, R.D., J.G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *The Journal of cell biology*. 116:1071-1080.
- Klumperman, J. 2000. Transport between ER and Golgi. *Current opinion in cell biology*. 12:445-449.
- Klumperman, J., A. Schweizer, H. Clausen, B.L. Tang, W. Hong, V. Oorschot, and H.P. Hauri. 1998. The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *Journal of cell science*. 111 (Pt 22):3411-3425.
- Kogai, T., T. Endo, T. Saito, A. Miyazaki, A. Kawaguchi, and T. Onaya. 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., K. Taki, and G.A. Brent. 2006. Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 13:797-826.

- Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*. 54:631-664.
- Kreis, T.E., M. Lowe, and R. Pepperkok. 1995. COPs regulating membrane traffic. *Annual review of cell and developmental biology*. 11:677-706.
- Lee, M.C., E.A. Miller, J. Goldberg, L. Orci, and R. Schekman. 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual review of cell and developmental biology*. 20:87-123.
- Levy, O., G. Dai, C. Riedel, C.S. Ginter, E.M. Paul, A.N. Lebowitz, and N. Carrasco. 1997. Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ 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., S.A. Jesch, A. Mehta, T.H. Lee, R. Garcia-Mata, D.S. Nelson, and E. Sztul. 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.
- Lippincott-Schwartz, J., J.F. Presley, K.J. Zaal, K. Hirschberg, C.D. Miller, and J. Ellenberg. 1999. Monitoring the dynamics and mobility of membrane proteins tagged with green fluorescent protein. *Methods in cell biology*. 58:261-281.
- Lippincott-Schwartz, J., T.H. Roberts, and K. Hirschberg. 2000. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annual review of cell and developmental biology*. 16:557-589.
- Lippincott-Schwartz, J., and C.L. Smith. 1997. Insights into secretory and endocytic membrane traffic using green fluorescent protein chimeras. *Current opinion in neurobiology*. 7:631-639.
- Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy. 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:444-456.
- Lippincott-Schwartz, J., L.C. Yuan, J.S. Bonifacino, and R.D. Klausner. 1989. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell*. 56:801-813.
- Lord, C., D. Bhandari, S. Menon, M. Ghassemian, D. Nycz, J. Hay, P. Ghosh, and S. Ferro-Novick. 2011. Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature*. 473:181-186.
- Lorente-Rodriguez, A., and C. Barlowe. 2011. Entry and exit mechanisms at the cis-face of the Golgi complex. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3.
- Luo, R., and P.A. Randazzo. 2008. Kinetic analysis of Arf GAP1 indicates a regulatory role for coatomer. *The Journal of biological chemistry*. 283:21965-21977.
- Malhotra, V., T. Serafini, L. Orci, J.C. Shepherd, and J.E. Rothman. 1989. Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack. *Cell*. 58:329-336.
- Mancias, J.D., and J. Goldberg. 2008. Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery. *The EMBO journal*. 27:2918-2928.
- Martinez-Menarguez, J.A., H.J. Geuze, J.W. Slot, and J. Klumperman. 1999. Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell*. 98:81-90.

- Matsuoka, K., L. Orci, M. Amherdt, S.Y. Bednarek, S. Hamamoto, R. Schekman, and T. Yeung. 1998. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. 93:263-275.
- Mellman, I., and K. Simons. 1992. The Golgi complex: in vitro veritas? *Cell*. 68:829-840.
- Miles, S., H. McManus, K.E. Forsten, and B. Storrie. 2001. Evidence that the entire Golgi apparatus cycles in interphase HeLa cells: sensitivity of Golgi matrix proteins to an ER exit block. *The Journal of cell biology*. 155:543-555.
- Miller, E.A., and C. Barlowe. 2010. Regulation of coat assembly--sorting things out at the ER. *Current opinion in cell biology*. 22:447-453.
- Mironov, A.A., G.V. Beznoussenko, R.S. Polishchuk, and A. Trucco. 2005. Intra-Golgi transport: a way to a new paradigm? *Biochimica et biophysica acta*. 1744:340-350.
- Miserey-Lenkei, S., G. Chalancon, S. Bardin, E. Formstecher, B. Goud, and A. Echard. 2010. Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nature cell biology*. 12:645-654.
- Mizuno-Yamasaki, E., F. Rivera-Molina, and P. Novick. 2012. GTPase networks in membrane traffic. *Annual review of biochemistry*. 81:637-659.
- Monetta P, S.I., Romero N, Alvarez C. 2007. Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell*. 18:2400-2410.
- Monetta, P., I. Slavin, N. Romero, and C. Alvarez. 2007. Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Molecular biology of the cell*. 18:2400-2410.
- Mothes, W., S.U. Heinrich, R. Graf, I. Nilsson, G. von Heijne, J. Brunner, and T.A. Rapoport. 1997. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell*. 89:523-533.
- Moyer, B.D., B.B. Allan, and W.E. Balch. 2001. Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis--Golgi tethering. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 2:268-276.
- Mukhopadhyay, A., J.A. Quiroz, and A.W. Wolkoff. 2014. Rab1a regulates sorting of early endocytic vesicles. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 306:G412-424.
- Murphy, L.O., and J. Blenis. 2006. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in biochemical sciences*. 31:268-275.
- Nakamura, N., C. Rabouille, R. Watson, T. Nilsson, N. Hui, P. Slusarewicz, T.E. Kreis, and G. Warren. 1995. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *The Journal of cell biology*. 131:1715-1726.
- Nelson, D.S., C. Alvarez, Y.S. Gao, R. Garcia-Mata, E. Fialkowski, and E. Sztul. 1998. The membrane transport factor TAP/p115 cycles between the Golgi and earlier secretory compartments and contains distinct domains required for its localization and function. *The Journal of cell biology*. 143:319-331.
- Niu, T.K., A.C. Pfeifer, J. Lippincott-Schwartz, and C.L. Jackson. 2005. Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Molecular biology of the cell*. 16:1213-1222.
- Nuoffer, C., H.W. Davidson, J. Matteson, J. Meinkoth, and W.E. Balch. 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.

- O'Donnell, J., K. Maddox, and S. Stagg. 2011. The structure of a COPII tubule. *Journal of structural biology*. 173:358-364.
- Ohno, M., M. Zannini, O. Levy, N. Carrasco, and R. di Lauro. 1999. The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Molecular and cellular biology*. 19:2051-2060.
- Orci, L., A. Perrelet, M. Ravazzola, F.T. Wieland, R. Schekman, and J.E. Rothman. 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, D., M. Medkova, C. Walch-Solimena, and P. Novick. 2002. Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *The Journal of cell biology*. 157:1005-1015.
- Paire, A., F. Bernier-Valentin, S. Selmi-Ruby, and B. Rousset. 1997. Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity. *The Journal of biological chemistry*. 272:18245-18249.
- Pearson, L.L., B.E. Castle, and M.R. Kehry. 2001. CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *International immunology*. 13:273-283.
- Pelham, H.R. 2001a. SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends in cell biology*. 11:99-101.
- Pelham, H.R. 2001b. Traffic through the Golgi apparatus. *The Journal of cell biology*. 155:1099-1101.
- Pereira-Leal, J.B., and M.C. Seabra. 2000. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *Journal of molecular biology*. 301:1077-1087.
- Peyroche, A., B. Antony, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils, and C.L. Jackson. 1999. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Molecular cell*. 3:275-285.
- Pfeffer, S., and D. Aivazian. 2004. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5:886-896.
- Pfeffer, S.R. 1999. Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nature cell biology*. 1:E17-22.
- Pfeffer, S.R. 2001. Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends in cell biology*. 11:487-491.
- Pfeffer, S.R. 2005. Structural clues to Rab GTPase functional diversity. *The Journal of biological chemistry*. 280:15485-15488.
- Pfeffer, S.R. 2013. Rab GTPase regulation of membrane identity. *Current opinion in cell biology*. 25:414-419.
- Pfeffer, S.R., and J.E. Rothman. 1987. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annual review of biochemistry*. 56:829-852.
- Polonsky K, M.S., Kronenberg H M. 2011. Williams: Libro de Endocrinología. E. Saunders, editor, Philadelphia - Estados Unidos.

- Pomerance, M., H.B. Abdullah, S. Kamerji, C. Correze, and J.P. Blondeau. 2000. Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade. Involvement of protein kinase A, rac1, and reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry*. 275:40539-40546.
- Presley, J.F., N.B. Cole, T.A. Schroer, K. Hirschberg, K.J. Zaal, and J. Lippincott-Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*. 389:81-85.
- Presley, J.F., T.H. Ward, A.C. Pfeifer, E.D. Siggia, R.D. Phair, and J. Lippincott-Schwartz. 2002. Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature*. 417:187-193.
- Pulvirenti, T., M. Giannotta, M. Capestrano, M. Capitani, A. Pisanu, R.S. Polishchuk, E. San Pietro, G.V. Beznoussenko, A.A. Mironov, G. Turacchio, V.W. Hsu, M. Sallese, and A. Luini. 2008. A traffic-activated Golgi-based signalling circuit coordinates the secretory pathway. *Nature cell biology*. 10:912-922.
- Rexach, M.F., M. Latterich, and R.W. Schekman. 1994. Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *The Journal of cell biology*. 126:1133-1148.
- Richards, B., and E. Wolf. 1959. Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. II. Structure of the Image Field in an Aplanatic System. 358-379 pp.
- Rink, J., E. Ghigo, Y. Kalaidzidis, and M. Zerial. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*. 122:735-749.
- Rivera-Molina, F.E., and P.J. Novick. 2009. A Rab GAP cascade defines the boundary between two Rab GTPases on the secretory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:14408-14413.
- Rodriguez-Boulan, E., and A. Musch. 2005. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochimica et biophysica acta*. 1744:455-464.
- Romero, N., C.I. Dumur, H. Martinez, I.A. Garcia, P. Monetta, I. Slavin, L. Sampieri, N. Koritschoner, A.A. Mironov, M.A. De Matteis, and C. Alvarez. 2013. Rab1b overexpression modifies Golgi size and gene expression in HeLa cells and modulates the thyrotrophin response in thyroid cells in culture. *Molecular biology of the cell*. 24:617-632.
- Sacher, M., J. Barrowman, W. Wang, J. Horecka, Y. Zhang, M. Pypaert, and S. Ferro-Novick. 2001. TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Molecular cell*. 7:433-442.
- Sallese, M., T. Pulvirenti, and A. Luini. 2006. The physiology of membrane transport and endomembrane-based signalling. *The EMBO journal*. 25:2663-2673.
- Satoh, A., Y. Wang, J. Malsam, M.B. Beard, and G. Warren. 2003. Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 4:153-161.
- Scales, S.J., R. Pepperkok, and T.E. Kreis. 1997. Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell*. 90:1137-1148.
- Sciaky, N., J. Presley, C. Smith, K.J. Zaal, N. Cole, J.E. Moreira, M. Terasaki, E. Siggia, and J. Lippincott-Schwartz. 1997. Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *The Journal of cell biology*. 139:1137-1155.
- Schekman, R., and L. Orci. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science (New York, N.Y.)*. 271:1526-1533.

- Schwaninger, R., H. Plutner, G.M. Bokoch, and W.E. Balch. 1992. Multiple GTP-binding proteins regulate vesicular transport from the ER to Golgi membranes. *The Journal of cell biology*. 119:1077-1096.
- Schweizer, A., J.A. Fransen, T. Bachi, L. Ginsel, and H.P. Hauri. 1988. Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *The Journal of cell biology*. 107:1643-1653.
- Seabra, M.C., M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 1993. Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science (New York, N.Y.)*. 259:377-381.
- Seabra, M.C., and C. Wasmeier. 2004. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Current opinion in cell biology*. 16:451-457.
- Segev, N. 2011. Coordination of intracellular transport steps by GTPases. *Seminars in cell & developmental biology*. 22:33-38.
- Shiba, Y., and P.A. Randazzo. 2012. ArfGAP1 function in COPI mediated membrane traffic: currently debated models and comparison to other coat-binding ArfGAPs. *Histology and histopathology*. 27:1143-1153.
- Shisheva, A., S.R. Chinni, and C. DeMarco. 1999. General role of GDP dissociation inhibitor 2 in membrane release of Rab proteins: modulations of its functional interactions by in vitro and in vivo structural modifications. *Biochemistry*. 38:11711-11721.
- Short, B., A. Haas, and F.A. Barr. 2005. Golgins and GTPases, giving identity and structure to the Golgi apparatus. *Biochimica et biophysica acta*. 1744:383-395.
- Shorter, J., M.B. Beard, J. Seemann, A.B. Dirac-Svejstrup, and G. Warren. 2002. Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *The Journal of cell biology*. 157:45-62.
- Singan, V.R., K. Handzic, and J.C. Simpson. 2012. Quantitative image analysis approaches for probing Rab GTPase localization and function in mammalian cells. *Biochemical Society transactions*. 40:1389-1393.
- Singer-Kruger, B., H. Stenmark, and M. Zerial. 1995. Yeast Ypt51p and mammalian Rab5: counterparts with similar function in the early endocytic pathway. *Journal of cell science*. 108 (Pt 11):3509-3521.
- Sivars, U., D. Aivazian, and S.R. Pfeffer. 2003. Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature*. 425:856-859.
- Slavin, I., I.A. Garcia, P. Monetta, H. Martinez, N. Romero, and C. Alvarez. 2011. Role of Rab1b in COPII dynamics and function. *European journal of cell biology*. 90:301-311.
- Sonnichsen, B., M. Lowe, T. Levine, E. Jamsa, B. Dirac-Svejstrup, and G. Warren. 1998. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *The Journal of cell biology*. 140:1013-1021.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:513-525.
- Stenmark, H., and V.M. Olkkonen. 2001. The Rab GTPase family. *Genome biology*. 2:Reviews3007.
- Stephens, D.J. 2012. Functional coupling of microtubules to membranes - implications for membrane structure and dynamics. *Journal of cell science*. 125:2795-2804.

- Stephens, D.J., N. Lin-Marq, A. Pagano, R. Pepperkok, and J.P. Paccaud. 2000. COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites. *Journal of cell science*. 113 (Pt 12):2177-2185.
- Storrie, B., and T. Nilsson. 2002. The Golgi apparatus: balancing new with old. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 3:521-529.
- Storrie, B., J. White, S. Rottger, E.H. Stelzer, T. Sukanuma, and T. Nilsson. 1998. Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *The Journal of cell biology*. 143:1505-1521.
- Sztul, E., and V. Lupashin. 2009. Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *FEBS letters*. 583:3770-3783.
- Szul, T., R. Garcia-Mata, E. Brandon, S. Shestopal, C. Alvarez, and E. Sztul. 2005. Dissection of membrane dynamics of the ARF-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 6:374-385.
- Szul, T., R. Grabski, S. Lyons, Y. Morohashi, S. Shestopal, M. Lowe, and E. Sztul. 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.
- Szul, T., and E. Sztul. 2011. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda, Md.)*. 26:348-364.
- Takai, Y., T. Sasaki, and T. Matozaki. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews*. 81:153-208.
- Tang, B.L., S.H. Low, H.P. Hauri, and W. Hong. 1995. Segregation of ERGIC53 and the mammalian KDEL receptor upon exit from the 15 degrees C compartment. *European journal of cell biology*. 68:398-410.
- Thor, F., M. Gautschi, R. Geiger, and A. Helenius. 2009. Bulk flow revisited: transport of a soluble protein in the secretory pathway. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 10:1819-1830.
- Tisdale, E.J., J.R. Bourne, R. Khosravi-Far, C.J. Der, and W.E. Balch. 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., P. Chardin, and A. Tavitian. 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.
- Tsygankova, O.M., A. Saavedra, J.F. Rebhun, L.A. Quilliam, and J.L. Meinkoth. 2001. Coordinated regulation of Rap1 and thyroid differentiation by cyclic AMP and protein kinase A. *Molecular and cellular biology*. 21:1921-1929.
- Van Heuverswyn, B., C. Streydio, H. Brocas, S. Refetoff, J. Dumont, and G. Vassart. 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.
- Vasudevan, C., W. Han, Y. Tan, Y. Nie, D. Li, K. Shome, S.C. Watkins, E.S. Levitan, and G. Romero. 1998. The distribution and translocation of the G protein ADP-ribosylation

- factor 1 in live cells is determined by its GTPase activity. *Journal of cell science*. 111 (Pt 9):1277-1285.
- Vivanco, I., and C.L. Sawyers. 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer*. 2:489-501.
- Wang, W., M. Sacher, and S. Ferro-Novick. 2000. TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *The Journal of cell biology*. 151:289-296.
- Ward, T.H., R.S. Polishchuk, S. Caplan, K. Hirschberg, and J. Lippincott-Schwartz. 2001. Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *The Journal of cell biology*. 155:557-570.
- Warren, G., and I. Mellman. 1999. Bulk flow redux? *Cell*. 98:125-127.
- Waters, M.G., I.C. Griff, and J.E. Rothman. 1991. Proteins involved in vesicular transport and membrane fusion. *Current opinion in cell biology*. 3:615-620.
- Waters, M.G., and S.R. Pfeffer. 1999. Membrane tethering in intracellular transport. *Current opinion in cell biology*. 11:453-459.
- Watson, P., A.K. Townley, P. Koka, K.J. Palmer, and D.J. Stephens. 2006. Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. 7:1678-1687.
- Weide, T., M. Bayer, M. Koster, J.P. Siebrasse, R. Peters, and A. Barnekow. 2001. The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b. *EMBO reports*. 2:336-341.
- Weide, T., J. Teuber, M. Bayer, and A. Barnekow. 2003. MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 306:79-86.
- Weiss, S.J., N.J. Philp, F.S. Ambesi-Impiombato, and E.F. Grollman. 1984. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology*. 114:1099-1107.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*. 118:843-846.
- Whyte, J.R., and S. Munro. 2002. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *Journal of cell science*. 115:2627-2637.
- Wild, K., M. Halic, I. Sinning, and R. Beckmann. 2004. SRP meets the ribosome. *Nature structural & molecular biology*. 11:1049-1053.
- Xu, D., and J.C. Hay. 2004. Reconstitution of COPII vesicle fusion to generate a pre-Golgi intermediate compartment. *The Journal of cell biology*. 167:997-1003.
- Yoshihisa, T., C. Barlowe, and R. Schekman. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y.)*. 259:1466-1468.
- Yu, S., A. Satoh, M. Pypaert, K. Mullen, J.C. Hay, and S. Ferro-Novick. 2006. mBet3p is required for homotypic COPII vesicle tethering in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 174:359-368.
- Yu, X., M. Breitman, and J. Goldberg. 2012. A structure-based mechanism for Arf1-dependent recruitment of coatamer to membranes. *Cell*. 148:530-542.
- Zenner, H.L., S. Yoshimura, F.A. Barr, and C.M. Crump. 2011. Analysis of Rab GTPase-activating proteins indicates that Rab1a/b and Rab43 are important for herpes simplex virus 1 secondary envelopment. *Journal of virology*. 85:8012-8021.

- Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:107-117.
- Zhao, L., J.B. Helms, B. Brugger, C. Harter, B. Martoglio, R. Graf, J. Brunner, and F.T. Wieland. 1997. Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:4418-4423.
- Zinchuk, V., O. Zinchuk, and T. Okada. 2007. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta histochemica et cytochemica*. 40:101-111.