



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de doctorado en Biotecnología

**“TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS DE
LA FAMILIA p24 EN CÉLULAS VEGETALES”**

Juan Carlos Montesinos López

Tesis dirigida por:

Dr. Fernando Aniento Company

Dra. María Jesús Marcote Zaragoza

Valencia 2014



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de doctorado en Biotecnología

**“TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS DE
LA FAMILIA p24 EN CÉLULAS VEGETALES”**

Trabajo original presentado por Juan Carlos Montesinos López para optar
al título de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, 20 de Octubre de 2014

Fdo. Juan Carlos Montesinos López



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FERNANDO ANIENTO COMPANYY, Catedrático de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia y

MARÍA JESÚS MARCOTE ZARAGOZA, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

1. Que la presente memoria titulada "TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA p24 EN CÉLULAS VEGETALES" ha sido realizada por el Licenciado en Farmacia Juan Carlos Montesinos López bajo nuestra dirección, y que, habiendo revisado el trabajo, consideramos que reúne las condiciones necesarias para optar al TÍTULO DE DOCTOR.
2. Que habiéndose realizado la Memoria de Tesis por la modalidad de compendio de publicaciones, siendo el doctorando el primer firmante y siendo ellos los coautores de dichas publicaciones, declaran que el doctorando ha sido responsable del trabajo experimental, participando interactivamente con ellos en su diseño, en el análisis de los resultados, extracción de las conclusiones, y en la redacción de los trabajos publicados.
3. Que ninguna de las publicaciones compendiadas en esta Tesis ha sido utilizada por otros para la realización de una tesis doctoral.
4. Que los indicadores de calidad de las publicaciones recogidas en esta tesis son los siguientes:
 - a. Journal of Experimental Botany (2 publicaciones), índice de impacto de 5,794, en la posición 11 entre las 196 revistas del campo de "Plant Sciences". Además se encuentra entre las 100 revistas más influyentes en Medicina y Biología de estos últimos 100 años, según la Special Libraries Association (SLA).
 - b. Plant Journal, con índice de impacto 6,815, en la posición 7 entre las 196 revistas en el campo de "Plant Sciences".

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Burjassot, a 20 de Octubre de 2014.

Fdo. **Fernando Aniento Company**

Fdo. **María Jesus Marcote Zaragoza**

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la financiación de los siguientes proyectos:

1. “Tráfico intracelular de transportadores de salida de auxina aniónica de la familia PIN y de potenciales receptores de carga de la familia p24 en células vegetales”. Plan Nacional de I+D. Programa de Biología Fundamental (BFU2006-01149). I.P. Fernando Aniento.
2. “Tráfico intracelular de transportadores de salida de auxina aniónica de la familia PIN y de potenciales receptores de carga de la familia p24 en células vegetales”. Generalitat Valenciana, Acciones Complementarias (GVACOMP2009-027). I.P. Fernando Aniento.
3. “Proteomics analysis of endosomal compartments in *Arabidopsis*”. Comisión Europea. Programa ERA (European Research Area)-NET Plant Genomics (ERAGFP/06.069A). I.P. Gerd Jürgens.
4. “Tráfico intracelular de proteínas en células vegetales”. Plan Nacional de I+D. Programa de Biología Fundamental (BFU2009-07039). I.P. Fernando Aniento.
5. “Tráfico intracelular de proteínas en células vegetales”. Plan Nacional de I+D. Programa de Biología Fundamental (BFU2012-33883). I.P. Fernando Aniento.

El presente trabajo de investigación ha sido desarrollado durante el periodo de disfrute de una beca predoctoral FPU (Formación Profesorado Universitario) del Ministerio de Educación (AP2008-01433), durante los años 2009-2013, y una ayuda para la realización de Estancias Breves en el “Institut for Plant Sciences” de la Universidad de Heidelberg (Alemania), dentro del programa de Formación de Profesorado Universitario (Ayuda Estancias Breves 2011) del Ministerio de Educación.

AGRADECIMIENTOS

Después de este largo viaje que ha supuesto el doctorado no quería desaprovechar la ocasión para agradecer a todos aquellos que han hecho que esta tesis sea una realidad.

Me gustaría agradecer a mis directores Fernando y María Jesús toda la dedicación, la paciencia que han tenido, el esfuerzo dedicado y todo el conocimiento que me han aportado, me he intentado ir con un buen saco de todo ello tras estos años... A mi alma gemela de la ciencia, Gloria, no me imagino todos estos años de carrera, master, doctorado... (fiestas y aventuras)...sin tenerte conmigo, dándome siempre el otro punto de vista que me hacía falta... a Esther por introducirme en el mundo de la ciencia y el laboratorio, dándome los trucos justos... por supuesto a los dos pequeños del laboratorio, Noelia y Joan. Noelia estoy seguro que serás una digna sucesora, y Joan, espero que al fin encuentres un sitio donde aplicar todo ese conocimiento que tienes. También quiero acordarme de toda la gente del Departamento de Bioquímica porque a lo largo de estos años todos han puesto un granito de arena para que esto suceda. Y como no a Pilar, esa técnica todoterreno que ha facilitado tanto mi trabajo.

Es imposible no acordarse de un grupo de personas que han sido fundamentales en este proceso y que no trabajan dentro del laboratorio, MIS AMIGOS. Dicen que son pocos los que pasan por tu vida y dejan huella, y que se pueden contar con los dedos de una mano, pero las reglas siempre tienen excepciones y yo me siento una, porque siento que cada uno es algo especial para mí. Es imposible nombrar a todos, pero en especial me quiero acordar de mi grupo de amigos de toda la vida, Lore, todo lo que pueda decirte es poco después de toda una vida juntos (y la que nos queda!), gracias de corazón por estar siempre ahí... y dentro de poco disfrutando de Lucas (que ganas!), Sergio, gracias por ser siempre el lado exigente en momentos buenos y el amigo de verdad que hace falta en situaciones difíciles.... Deborah, con pocas personas puedo entenderme tanto con solo mirarnos, gracias de verdad por ser lo que eres, Gaspar, gracias por hacerme sacar siempre el máximo potencial que llevo dentro y por esos años de convivencia que nunca olvidaré, Estela, ya sabes que has sido siempre especial para mí (y lo serás) y haces que el engranaje de mi vida siga funcionando, Leti, mi compañera de fatigas en este mundo de la investigación, gracias por tanto consejo, a ver si el destino nos junta un poco más, Alberto, mi amigo más místico y bohemio, gracias de verdad por darle siempre un punto distinto a todo lo que hacemos y Saray, siempre arreglando el mundo tomando algo debajo de casa, gracias de verdad a todos.

Hay un grupo de amigos que llegaron más tarde, que vinieron para quedarse y que son pieza fundamental en mi vida, Adri, ya sabes que existen pocas personas como tú, tan especiales para mí, gracias por todo de verdad, Miguel, gracias por ser tan amigo, hacerlo todo siempre tan fácil y por tus sabios consejos, Alba, la vida nos agita pero no nos tumba, cree un poco más en ti porque mereces la pena, lo superaremos ya verás, Alfre, no concibo este grupo sin un amigo como tú, dando siempre el punto diferente y tan necesario en la vida, Nadia, ese pequeño ser que me aporta tanto cariño que tanto hace falta, gracias amiga... y Mari, las subidas y bajadas siempre hacen que una persona sea mejor, coges lo bueno y abandonas lo malo, gracias de verdad.

Mención especial a mis Titis (Borja, Fran, Charly) y mi "amiga" Marta, no hay nadie como vosotros para desconectar y pasárselo en grande, sois los mejores. A mis compis de piso,

Fernando y Paula, gracias por estos años en el piso, por tanta risa, apoyo y por hacer que todo quedara a un lado en cuanto entraba al piso, a mi Primico Igna, porque cuando estoy contigo es como estar en familia, y no se puede pedir nada mejor que eso, gracias por considerarme uno más. A mis amigos Juanan (Sr. Frodo) y Mariola, gracias por tantos buenos momentos, risas y entendimiento, y a la pequeña Gala por sacarme siempre una sonrisa.

Tampoco quiero olvidarme de mi gente de la Penya Malfaeners, que me ha enseñado a que no hay nada imposible y que todo se puede conseguir. A mis Tocados, María, Mati, Gema, Ana, Joan, Neus... gracias de verdad por todos los años que he pasado en Valencia, me habéis hecho sentir como en casa y en familia, el trabajo se empeña en separarnos pero conseguiremos seguir unidos (gracias Skype!). Es importante para mí también dedicar unas líneas de agradecimiento a aquellos amigos que son prácticamente de la familia, todos mis buenos recuerdos de la niñez van ligados a ellos, gracias Ana, Fernando, Concha, Toni, Noe y Marta.

Para el final me he dejado el pilar de más peso, MI FAMILIA. Me siento súper afortunado de tener dos familias como los Montesinos y los López, y de tenerlos a todos tan cerca. Ellos son los que verdaderamente me han visto formarme como persona. Gracias en especial a mis tías, tíos, abuelos, abuelas, primos, primas, y por supuesto a los que ya no están pero que han dejado una huella imborrable... no hay nada más terapéutico y que te cargue más las pilas que todas estas reuniones familiares, barbacoas, fiestas... a mis tías Candy y Mamen que siempre me han cuidado y mimado tanto, a mis tías Mari y Toñi por ser siempre tan cercanas y preocuparse tanto por mí, a mis primos Yago y Alberto, gracias por ser mi referente todos estos años, la infancia es una buena base de lo que soy ahora, a Alberto y Lucas, dos primos muy especiales para mí, que estoy seguro que llegarán muy lejos, cada uno a su estilo, y que siempre tengo tan cerca, y muy en especial a mi laia, al final tenías razón, quien la sigue la consigue y no hay nada imposible, gracias por creer en mí y por ser siempre tan positiva.

Por último, y más importante para mí, el agradecimiento más grande que pueda existir es para mis padres Espe y Juan, y para mi hermana Tati, las mejores personas que uno podría desear para este recorrido que llamamos vida, y es por eso que me siento tan afortunado de tenerlas a mi lado, gracias por darme la oportunidad de alcanzar todo lo que me he propuesto, esta tesis es tan mía como vuestra.

a José

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	19
1. TRÁFICO INTRACELULAR DE MEMBRANAS	19
1.1. Etapas de los procesos de tráfico vesicular	20
1.2. Principios fundamentales del transporte vesicular	22
2. LA VÍA SECRETORA	23
2.1. La vía secretora temprana	26
2.2. Transporte a la membrana plasmática/superficie celular	31
2.3. Secreción no convencional	31
2.4. Transporte a vacuola	33
3. MECANISMOS MOLECULARES DEL TRANSPORTE A LO LARGO DE LA VÍA SECRETORA TEMPRANA	34
3.1. Vesículas COPII	34
3.1.1. Formación de vesículas COPII	34
3.1.2. Otros componentes de las vesículas COPII	35
3.1.3. Señales de clasificación en vesículas COPII	36
3.2. Vesículas COPI	37
3.2.1. Formación de vesículas COPI	37
3.2.2. Otros componentes de las vesículas COPI	40
3.2.3. Señales de clasificación en vesículas COPI	41
3.3. Fusión de vesículas en la interfase ER-Golgi	43
3.3.1. GTPasas de la Familia Rab	43
3.3.2. Factores de adhesión (“tethering factors”)	44
3.3.3. Proteínas SNARE	45
4. PROTEÍNAS p24	47
4.1. Estructura	47
4.2. Funciones	49
4.3. Reconocimiento de cargo	49
4.4. Clasificación y nomenclatura	50
4.5. Localización	52
5. RECEPTOR K/HDEL (ERD2)	55

5.1. Funciones	55
5.2. Localización	57
5.3. Clasificación	59
OBJETIVOS	63
RESULTADOS	65
1. RESUMEN DE LOS ARTÍCULOS	69
2. ARTÍCULOS	79
2.1. Artículo 1: “Coupled transport of <i>Arabidopsis</i> p24 proteins at the ER–Golgi interface” (Montesinos et al., 2012)	81
2.2. Artículo 2: “Putative p24 complexes in <i>Arabidopsis</i> contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway” (Montesinos et al., 2013)	117
2.3. Artículo 3: “ <i>Arabidopsis</i> p24 δ 5 and p24 δ 9 facilitate COPI-dependent Golgi-to-ER transport of the K/HDEL receptor ERD2” (Montesinos et al., 2014)	147
DISCUSIÓN GENERAL	199
1. LA FAMILIA p24 DE PLANTAS	199
2. LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS p24	199
3. TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS p24	202
3.1. Transporte de proteínas p24 en la vía secretora temprana	202
3.2. Determinantes estructurales para la localización de las proteínas p24 ..	204
4. INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS p24 Y TRÁFICO ACOPLADO DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA p24	206
5. APROXIMACIONES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS p24.....	210
5.1. Pérdida de función de proteínas p24	210
5.2. Implicación de las proteínas p24 en el transporte retrógrado del Receptor K/HDEL (ERD2) al ER dependiente de vesículas COPI	210
CONCLUSIONES	219
BIBLIOGRAFÍA	223

ABREVIATURAS

6 kDa-VP: Proteína viral de 6 kDa, marcador putativo de ERES	LE: Endosoma tardío (“Late Endosome”)
ARF1: Factor de ribosilación del ADP 1 (“ADP-Ribosylation Factor 1”)	LSP: Proteínas de secreción sin secuencia señal (“leaderless secretory proteins”)
CC: Dominio “coiled-coil”	MVB: Cuerpo multivesicular (“multivesicular body”)
CCV: Vesículas cubiertas de clatrina (“clathrin-coated vesicles”)	PI(4)P: Fosfatidilinositol-4-fosfato
COP: Proteína de cubierta (“Coat Protein”)	PVC: Compartimento prevacuolar (“Prevacuolar compartment”)
EE: Endosoma temprano (“Early endosome”)	RFP: Proteína roja fluorescente (“Red fluorescent protein”)
ER: Retículo endoplasmático (“Endoplasmic reticulum”)	Sar1: Proteína relacionada con Ras, asociada a secreción 1 (“Secretion-associated, Ras-related protein 1”)
ERD2: Receptor K/HDEL-2. Retención en ER defectuosa (“ER-retention defective”)	SNARE: Acrónimo del inglés “Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor”
ERES: Sitios de salida del retículo endoplasmático (“Endoplasmic Reticulum Export Sites”)	SP: Péptido señal (“signal peptide”)
ERGIC: Compartimento intermedio entre retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (“ER-Golgi intermediate compartment”)	TGN: Red del <i>trans</i> -Golgi (“ <i>trans</i> -Golgi network”)
GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (“Guanine nucleotide exchange factor”)	UPS: Secreción proteica no convencional (“unconventional protein secretion”)
GFP: Proteína verde fluorescente (“Green fluorescent protein”)	VSR: Receptor de clasificación vacuolar (“vacuolar sorting receptor”)
GOLD: Dominio que interviene en la dinámica del Golgi (“Golgi dynamics”)	VSS: Señal de clasificación vacuolar (“vacuolar sorting signal”)
GPI: Glicosilfosfatidilinositol	YFP: Proteína amarilla fluorescente (“Yellow fluorescent protein”)
GPI-AP: Proteínas unidas a GPI (“GPI-anchored proteins”)	

INTRODUCCIÓN

1. TRÁFICO INTRACELULAR DE MEMBRANAS

Las células eucariotas poseen un complejo sistema membranoso interno compuesto por diferentes compartimentos rodeados de membrana, con una composición molecular específica, y por tanto, funcionalmente distintos. Estos compartimentos u orgánulos deben estar comunicados o conectados entre sí, del mismo modo que cada célula debe comunicarse con su entorno. Esta comunicación es posible gracias a un complejo tráfico de membranas, proceso que está implicado en múltiples funciones celulares, tales como la síntesis proteica, el transporte de miles de moléculas a diferentes orgánulos o compartimentos, la secreción, la captación de moléculas extracelulares o la señalización. Por todo ello, la homeostasis celular, la comunicación célula-célula durante el desarrollo y la respuesta fisiológica a cambios en el ambiente dependen del tráfico de membranas (Park and Jurgens, 2012; Pfeffer, 2013).

Uno de los procesos de tráfico de membranas es el conocido como **endocitosis**. Entre otras funciones, este proceso permite a las células captar macromoléculas desde el medio extracelular, para su transporte hasta los lisosomas, orgánulos repletos de enzimas hidrolíticas que, esencialmente, degradan todo el material que reciben (Figura 1). Así, estas macromoléculas captadas desde el medio extracelular se degradan hasta sus moléculas constituyentes (aminoácidos, ácidos grasos, monosacáridos), que son liberadas al citosol y utilizadas para sintetizar las macromoléculas necesarias para el funcionamiento de las células. Además, la endocitosis juega un papel esencial en la regulación de los niveles de proteínas/receptores en la membrana plasmática o en procesos de señalización, entre otras funciones (Marsh and McMahon, 1999).

Este sistema membranoso interno permite además que las células eucarióticas puedan regular la liberación al exterior de proteínas, lípidos y glúcidos recién sintetizados. **La vía biosintética o secretora** se inicia en el retículo endoplásmico (ER), donde se sintetizan la mayoría de las proteínas transmembrana, los lípidos que forman la membrana de los diferentes orgánulos y de la membrana plasmática, las proteínas solubles destinadas al lumen del propio retículo endoplásmico, el complejo de Golgi o los lisosomas y también las proteínas que deben ser secretadas al exterior. Desde el ER, las moléculas recién sintetizadas pasan a través de un complejo sistema membranoso, el complejo de Golgi, donde son modificadas para ser finalmente exportadas hacia diferentes destinos, incluyendo la superficie celular, proceso conocido como exocitosis (Figura 1) (Hanton et al., 2005; Strating and Martens, 2009; Barlowe and Miller, 2013).

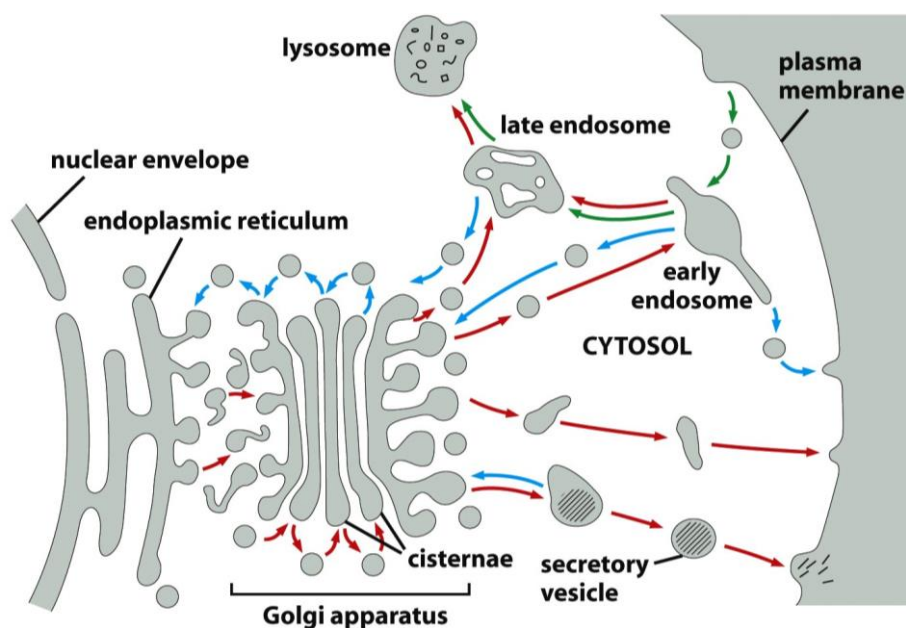


Figura 1. Esquema del tráfico vesicular en las vías secretora y endocítica (Alberts et al., 2008). Cada compartimento encierra un espacio equivalente topológicamente al exterior celular, y se comunican unos con otros a través del transporte vesicular. En la ruta biosintética/secretora (flechas rojas) las proteínas son transportadas desde el ER hacia la membrana plasmática y la superficie celular o hacia los endosomas tardíos y posteriormente los lisosomas. En la ruta endocítica (flechas verdes) las moléculas son introducidas a través de vesículas derivadas de la membrana plasmática y se liberan en los endosomas tempranos desde donde son transportados hasta los endosomas tardíos y los lisosomas. Muchas de las moléculas endocitadas son recuperadas desde endosomas tempranos devolviéndose a la superficie celular; de manera similar algunas moléculas son recuperadas desde los endosomas tardíos hacia el Golgi, y otras son recuperadas desde el Golgi hasta el ER. Todas estas rutas de recuperación están señalizadas con flechas azules.

1.1. ETAPAS DE LOS PROCESOS DE TRÁFICO VESICULAR

Gracias a una combinación de aproximaciones bioquímicas, genéticas y morfológicas, a la que han contribuido de forma significativa los tres galardonados con el premio nobel en Fisiología o Medicina de 2013 (J. Rothman, R. Schekman y T. Südhof), se acepta actualmente un modelo de transporte en el que pequeñas vesículas recubiertas (de un diámetro aproximado de 60-80 nm), actúan como transportadores que median el tráfico uni o bidireccional entre dos compartimentos membranosos (Rothman and Wieland, 1996; Nickel et al., 1997; Paul and Frigerio, 2007; Klann et al., 2012). Así, en un proceso de transporte vesicular, pueden distinguirse las siguientes etapas (Figura 2):

1. Gemación de la vesícula: las vesículas de transporte se generan en el “compartimento dador o de origen”, e incorporan las moléculas que deben ser transportadas (contenido o “carga”), así como aquellas moléculas necesarias para el transporte de la vesícula (por ejemplo para su interacción con elementos del citoesqueleto) o para el reconocimiento específico de la membrana diana. En esta etapa, las vesículas se recubren con una cubierta proteica específica, que va a participar en la selección de las moléculas que deber ser incluidas en la vesícula así

como en la deformación de la membrana necesaria para la formación de la misma. Las cubiertas más estudiadas son las cubiertas COP (“COat Protein”) I y COPII en la vía secretora temprana, y las cubiertas de clatrina en la vía secretora tardía y en la endocitosis.

2. Transporte de las vesículas: las vesículas generadas son transportadas desde el compartimento de origen hasta el “compartimento aceptor o diana”, en muchas ocasiones con la ayuda de elementos del citoesqueleto (filamentos de actina o microtúbulos).

3. Fusión: una vez las vesículas llegan al compartimento diana, se produce la fusión entre la membrana de la vesícula y la membrana de dicho compartimento, de manera que la carga de la vesícula es finalmente transferida a su destino. En esta etapa, van a ser determinantes tres procesos que ocurren de forma consecutiva, como son la eliminación de la cubierta de la vesícula, que permite la fusión de membranas entre la vesícula y la membrana diana, el reconocimiento de la membrana diana gracias a factores de adhesión o “tethering” y por último la fusión propiamente dicha, mediante el emparejamiento afín de la maquinaria de fusión de la vesícula y de la membrana diana (Hwang and Robinson, 2009).

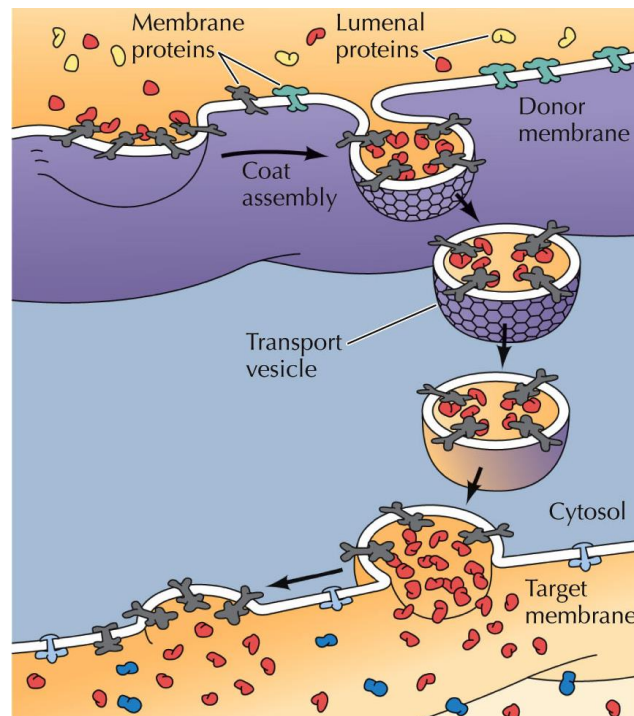


Figura 2. Etapas del tráfico vesicular (Cooper and Hausman, 2009). Vesículas conteniendo cargo (tanto proteínas solubles como proteínas de membrana) y moléculas accesorias son generadas en el compartimento dador (gemación) y son transportadas hacia el compartimento diana (transporte), donde se completa el proceso de transporte mediante la fusión entre la vesícula y la membrana diana, y la transferencia de cargo.

1.2. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DEL TRANSPORTE VESICULAR

Todos los compartimentos u orgánulos implicados en los procesos de transporte vesicular poseen una composición molecular bioquímicamente distinta, que determina su morfología y sus funciones. Para mantener la identidad diferencial de los orgánulos, durante los procesos de tráfico vesicular, así como para asegurar que las moléculas sean transportadas al compartimento correcto, existen dos principios fundamentales que rigen el tráfico intracelular de membranas:

1.2.1. Clasificación molecular (“molecular sorting”)

Cada vesícula de transporte que se genera, debe incluir y excluir selectivamente las moléculas apropiadas. Los componentes requeridos para el transporte de la vesícula y las moléculas que deben ser transportadas hasta el orgánulo diana (“contenido, cargamento o carga”), deben ser clasificados y seleccionados para formar parte de la misma y separados de aquellos componentes que deben permanecer en el orgánulo de origen (moléculas residentes). Esto puede conseguirse de tres modos:

- a) Las proteínas de cubierta o revestimiento que participan en la deformación de la membrana y la consiguiente formación de la vesícula, pueden interactuar con moléculas que deben ser incluidas en la vesícula gracias al reconocimiento de ciertos motivos (“señales de clasificación”) en su dominio citoplasmático, permitiendo que éstas se concentren en las vesículas nacientes (selección “positiva”).
- b) Las moléculas residentes en el orgánulo de origen pueden quedar retenidas por interacción con componentes del mismo, evitando su inclusión en la vesícula naciente (selección “negativa”).
- c) Aquellas moléculas residentes que por error o azar son incluidas en las vesículas nacientes pueden ser recuperadas por medio de las denominadas “vías de salvamento o de recuperación”.

1.2.2. Direccionamiento de las vesículas (“vesicle targeting”)

Cada vesícula generada en un compartimento de origen debe dirigirse y fusionarse únicamente con la membrana diana apropiada. Esto implica el reconocimiento previo de la membrana, el atraque de las vesículas sobre dicho orgánulo (proceso de acercamiento y anclaje a la membrana diana) y, finalmente, la fusión propiamente dicha. Diferentes tipos de

moléculas (GTPasas de la familia Rab, factores de adhesión o proteínas SNARE) garantizan la especificidad del proceso de fusión, como se describe en el apartado 3.3. de la introducción (Pelham, 2001; Pfeffer, 2001).

Gracias a estos dos principios es posible mantener la identidad diferencial de los orgánulos a pesar del flujo constante de componentes de membrana entre los diferentes compartimentos celulares.

2. LA VÍA SECRETORA

La vía secretora es un sistema complejo de orgánulos especializados en la síntesis, transporte, modificación y secreción de proteínas y otras moléculas, tales como hidratos de carbono complejos y lípidos. El tráfico en la vía secretora es muy dinámico y responde a demandas funcionales celulares concretas. Por tanto, este sistema juega un papel fundamental en la vida de la célula.

La vía secretora incluye el transporte de proteínas recién sintetizadas desde el ER hasta el aparato de Golgi (vía secretora temprana); el flujo a través de las distintas cisternas (*cis-medial-trans*) de dicho compartimento (donde van a ser modificadas) y el transporte desde la red del *trans*-Golgi (TGN) hasta la superficie celular o la membrana plasmática (vía secretora tardía), incluyendo además una vía lateral hacia los endosomas y los lisosomas (o hacia la vacuola en plantas) (Figura 3).

El ER es responsable de la síntesis, el plegamiento y el control de calidad de las proteínas que van a entrar en la vía secretora, así como de iniciar la glicosilación de la mayor parte del proteoma celular. Tiene una arquitectura única que se caracteriza por una red de tubos membranosos interconectados y hojas que forman polígonos cerrados, que se extiende desde la membrana nuclear hacia el citoplasma. La mayor parte de las proteínas son sintetizadas en el ER y transportadas al aparato de Golgi durante su biogénesis (Brandizzi and Barlowe, 2013).

El aparato de Golgi tiene numerosos papeles celulares fundamentales. En primer lugar, su función como plataforma central para conectar el transporte proteico anterógrado y retrógrado en la vía secretora. Además, el aparato de Golgi funciona por un lado como una “factoría” de carbohidratos complejos que proporciona el material necesario para formar la pared celular en plantas y la matriz glicoproteica en células animales, pero además como un dador de grupos para la glicosilación de proteínas. Por último, el aparato de Golgi proporciona

un “escalón” membranoso intermedio entre varias proteínas de señalización y de secreción (Brandizzi and Barlowe, 2013).

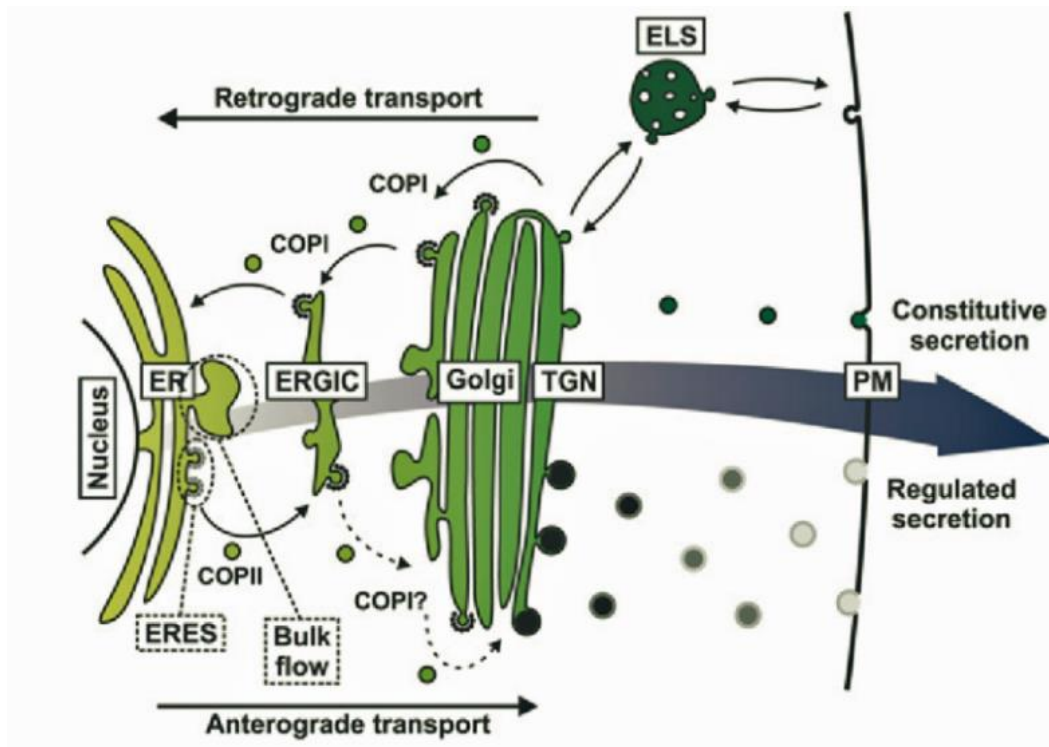


Figura 3. La vía secretora (Strating and Martens, 2009). Representación esquemática de los principales procesos de tráfico vesicular en la vía secretora. Las moléculas que van a secretarse y la maquinaria enzimática que va a formar parte de los diferentes orgánulos entran en la vía secretora a través del ER, donde se pliegan correctamente y se inicia parte de las modificaciones post-traduccionales. La salida del ER se produce a través de regiones especializadas conocidas como ERES (“ER Export Sites”), donde se empaquetan de manera selectiva las moléculas dentro de vesículas COPII. Estas vesículas se fusionan con el ERGIC en animales o la región *cis*-Golgi en plantas. En el aparato de Golgi, las moléculas sufren diferentes modificaciones post-traduccionales durante el tránsito a través de las distintas cisternas. Una vez alcanzada la región *trans*-Golgi (TGN), las moléculas pueden dirigirse hacia la membrana plasmática o el espacio extracelular (secreción constitutiva o secreción regulada en células especializadas en secreción); o bien dirigirse a compartimentos tales como endosomas y lisosomas (ELS, “endosomal/lysosomal system”) en animales, o vacuola en plantas. Existen rutas retrógradas de recuperación de moléculas en la vía secretora en dirección hacia el ER. El transporte retrógrado (*trans-cis*) entre las cisternas Golgi y entre el *cis*-Golgi y el ER está mediado por vesículas COPI.

Las proteínas de secreción y las proteínas solubles destinadas a distintos compartimentos de la vía secretora (ER, Golgi, membrana plasmática o vacuola) son incluidas en el sistema endomembranoso a través de un péptido señal N-terminal (SP, “signal peptide”) que permite su inserción co-traduccional en el ER, y que permite que estas proteínas sean dirigidas correctamente. En la mayoría de las proteínas, este péptido señal no va a formar

parte de la proteína madura, pero se ha observado que es necesario para su correcta traslocación al interior del lumen del ER.

El transporte de proteínas a través de la vía secretora está regulado por un transporte vesicular que llevan las moléculas transportadas desde un orgánulo al siguiente. Este transporte vesicular puede ocurrir tanto en dirección “hacia adelante” (transporte anterógrado), desde el ER hacia la membrana plasmática, o en dirección opuesta hacia el ER (transporte retrógrado).

El **transporte anterógrado** incluye la salida desde el ER hacia el complejo de Golgi, el transporte intra-Golgi (en dirección desde la cisterna *cis* a la cisterna *trans*) y el transporte desde la red *trans*-Golgi (TGN) hasta la membrana plasmática, o con una ruta lateral hacia los endosomas o la vacuola (a través de los endosomas tardíos) (Figura 3) (Brandizzi and Barlowe, 2013).

El **transporte retrógrado** es por definición la vía de tráfico de membranas en la cual un conjunto de compartimentos de membrana facilita el movimiento del cargo hacia el ER (Brandizzi and Barlowe, 2013). El transporte desde el Golgi hasta el ER y el transporte intra-Golgi (en dirección *trans-cis*) de proteínas residentes en el ER o de proteínas que ciclan en la vía secretora temprana ER-Golgi, también se incluye en la definición de transporte retrógrado. En este proceso de retorno desde el Golgi hasta el ER, se ha visto que juega un papel muy importante una familia de receptores K/HDEL, que permiten la recuperación de proteínas solubles residentes en el ER desde el complejo de Golgi. Estos receptores K/HDEL conocidos como receptores ERD2, se encargan de unir proteínas solubles que poseen una secuencia KDEL/HDEL en su extremo C-terminal y que deben residir en el ER (ver apartado 5 de la introducción).

La vía secretora funciona en equilibrio entre el transporte anterógrado y el retrógrado. Si se produjese algún tipo de disfunción en alguna parte de este equilibrio, podría resultar en alteraciones que producirían cambios dramáticos en la biología de la célula (Hanton et al., 2005).

Al conjunto de todos estos procesos se les conoce como “**vía clásica o convencional de secreción de proteínas**”, la cual es normalmente un proceso constitutivo y está altamente conservado entre eucariotas. Con muy pocas excepciones, incluyendo proteínas nucleares y

citoplasmáticas, las proteínas secretadas siguen esta vía convencional a través del complejo de Golgi.

2.1. VÍA SECRETORA TEMPRANA

Se conoce como vía secretora temprana al tráfico de proteínas ente el ER y el Golgi. El tráfico entre el ER y el aparato de Golgi es bidireccional: el transporte desde el ER hacia el Golgi está mediado por vesículas recubiertas de proteínas COPII, mientras que la ruta de retorno desde el Golgi (o desde el ERGIC, "ER-Golgi Intermediate Compartment", en mamíferos) hasta el ER está mediada por vesículas recubiertas de proteínas COPI (Figura 4) (Hawes et al., 2008; Budnik and Stephens, 2009; Strating and Martens, 2009; Sztul and Lupashin, 2009; Marti et al., 2010).

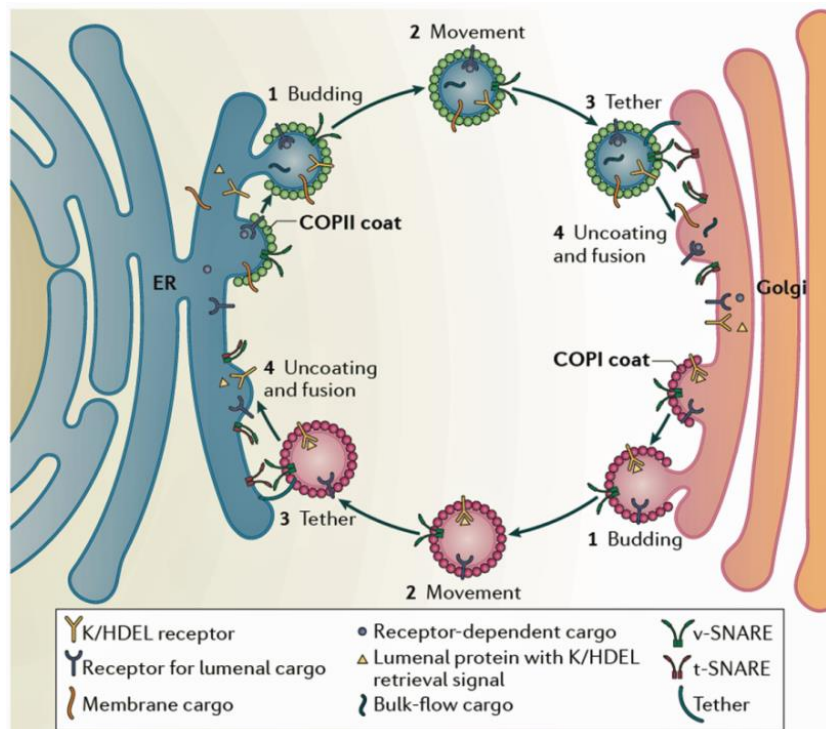


Figura 4. El transporte bidireccional entre ER y Golgi está mediado por vesículas COPI y COPII (Brandizzi and Barlowe, 2013). El transporte bidireccional entre ER y Golgi requiere la formación de vesículas recubiertas de proteínas COPI y COPII, su movimiento y adhesión a la membrana diana, el desensamblaje de la cubierta y la fusión de vesículas. Estas vesículas incluyen el transporte de cargos solubles, de proteínas de membrana y de cargos unidos a receptores de membrana. Las vesículas COPII facilitan el transporte selectivo de cargo hacia el Golgi. Una función importante de las vesículas COPI es facilitar el retorno de proteínas luminales que han escapado del ER y que contienen la señal K/HDEL. Estas proteínas son reconocidas por receptores K/HDEL que van a facilitar su transporte retrógrado hacia el ER. La adhesión y fusión de las vesículas en su orgánulo diana va a estar mediado por factores de adhesión y proteínas SNARE, respectivamente.

Por otra parte, se han publicado recientemente trabajos que sugieren mecanismos de salida de proteínas solubles de una manera independiente de vesículas COPII. Así, en mutantes con una depleción total (utilizando silenciamiento génico) de la proteína Sar1, proteína fundamental en el ensamblaje de vesículas COPII (ver más adelante, sección 3.1.1. de la introducción), no se produce la formación de estas vesículas pero sí que se sigue produciendo la salida desde el ER de proteínas solubles tales como la Albúmina o la proteína VSG-G (proteína G del virus de estomatitis vesicular, “Vesicular stomatitis virus G proteín”), aunque sí que se inhibe la salida del procolágeno-I (Cutrona et al., 2013). Existen otros ejemplos de secreción de proteínas en situaciones donde la formación de vesículas COPII está inhibida: en *Saccharomyces cerevisiae* la ausencia de Sec24 (componente de la cubierta COPII) no afecta a la salida de cargo desde el ER (Fatal et al., 2004); en *Danio rerio* (pez cebra), la eliminación de las dos isoformas de Sec23 (otro componente de la cubierta COPII) no produce muerte celular ni afecta a su capacidad de división celular (Melville and Knapik, 2011). Estas excepciones ponen de manifiesto la gran complejidad y diversidad de las diferentes vías en las cuales las proteínas cargo pueden ser transportadas desde el ER hasta su destino final. La existencia de vías de secreción donde la formación de vesículas COPII parece no ser fundamental, sugiere la existencia de vías de secreción de proteínas solubles desde el ER COPII-independientes.

Los **ERES** (sitios de salida del ER, “ER export sites”) son regiones especializadas en la superficie de las membranas del ER donde las subunidades de la cubierta de COPII son reclutadas y ensambladas para formar vesículas COPII que transportan cargos que van a salir desde el ER (Brandizzi and Barlowe, 2013). Las vesículas COPII generadas a partir del ER también se incluirían en la definición de ERES, que son estructuras relativamente inmóviles. Se ha demostrado recientemente que estas zonas se caracterizan por la ausencia de ribosomas y un acumulo de proteínas multidominio SEC16, que muy probablemente son requeridas para la formación de los sitios de salida del ER (Hughes et al., 2009). Modelos recientes sugieren que las proteínas SEC16 establecen un andamio que recluta a COPII en los sitios de salida a través de múltiples interacciones con las subunidades de la cubierta. Cada ERES da lugar a un compartimento intermedio entre ER y Golgi (ERGIC o “Vesicular Tubular Complex”, VTC,) en células de mamífero. Esta estructura se forma a partir de la fusión homotípica de vesículas COPII y transporta las proteínas de secreción una larga distancia (varios μm), por medio de microtúbulos, hasta el aparato de Golgi. Además, también actúa como el sitio de captura y reciclaje de proteínas residentes en el ER (Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006; Sztul and Lupashin, 2009).

Sin embargo, en las plantas superiores y en algunas levaduras no existe compartimento intermedio entre ER y Golgi (ERGIC), de modo que las vesículas COPII deben fusionarse homotípicamente para formar la primera cisterna *cis* o bien fusionarse con los bordes de la propia cisterna *cis*, por lo que la **organización de la interfase entre ER-Golgi varía entre distintas especies** (Figura 5). Las proteínas residentes del ER que salen del mismo sólo pueden reciclarse desde el aparato de Golgi (Hawes et al., 2008; Kang and Staehelin, 2008; Marti et al., 2010). Además, el aparato de Golgi en plantas es polidiserso, con dictiosomas individuales moviéndose rápidamente ($\text{varias } \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$) a lo largo de microfilamentos de actina en paralelo con los túbulos del ER. Las proteínas COPII se localizan en la estrecha interfase entre ER y Golgi. A medida que los dictiosomas se mueven, las proteínas COPII lo hacen también, sugiriendo un estrecho acoplamiento entre ERES y Golgi. Como consecuencia, se ha propuesto que ERES y Golgi constituyen una “unidad secretora” (Figura 6) (Hawes et al., 2008; Marti et al., 2010).

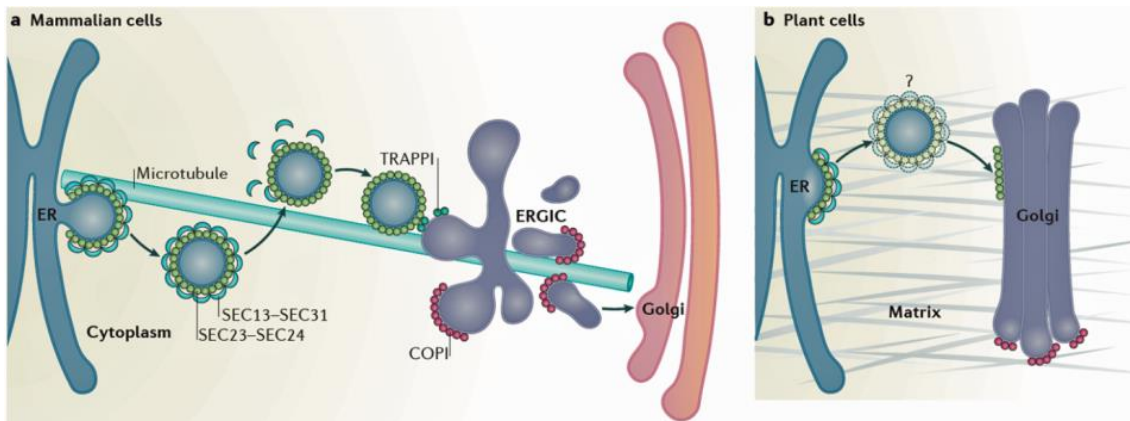


Figura 5. La interfase entre ER-Golgi tiene una organización distinta en mamíferos y en plantas (Brandizzi and Barlowe, 2013). **A:** En células de mamífero los ERES están orientados hacia el compartimento intermedio entre ER-Golgi, el ERGIC. La formación de las vesículas recubiertas por COPII tiene lugar en los ERES, donde se asocian a los microtúbulos para ser transportadas hacia el ERGIC. Después de la retirada de la cubierta COPII las vesículas se fusionan con el ERGIC, gracias a factores de adhesión tales como el TRAPPI. El proceso de reciclaje de proteínas residentes en ER desde el ERGIC es llevado a cabo por vesículas COPI. **B:** En células vegetales, los ERES y el Golgi están íntimamente relacionados, probablemente a través de una matriz que sostiene a ER y Golgi unidos. El transporte entre ambos orgánulos podría llevarse a cabo a través de vesículas COPII para ER-Golgi y vesículas COPI para el transporte retrógrado Golgi-ER. A diferencia de células de mamífero, el transporte ER-Golgi en células vegetales no utiliza un citoesqueleto de microtúbulos.

A diferencia de lo que sucede en otros eucariotas, la naturaleza exacta de la conexión entre ERES y Golgi no se conoce completamente en plantas. La movilidad de la vía secretora temprana en plantas sugiere al menos cuatro posibles modelos para el transporte de proteínas entre ER y Golgi en plantas (Figura 6):

- 1) **Modelo “kiss-and-run”:** el aparato de Golgi se mueve a lo largo del ER, parándose solo en sitios concretos, los ERES. Es en esos lugares donde exclusivamente se produce el transporte de proteínas, presumiblemente gracias a una señal aún no descubierta presente en los ERES fijos. Después de la transferencia del cargo desde ER hasta Golgi, el aparato de Golgi se mueve hasta su próximo ERES, para recoger más cargo (Nebenfuhr et al., 1999).
- 2) **Modelo unidad secretora:** el aparato de Golgi y los ERES se mueven conjuntamente, permitiendo un continuo transporte proteico entre ER y Golgi. En este modelo cada cisterna del Golgi tiene su propio ERES asociado y viajan conjuntamente a través de la superficie del ER (Neumann et al., 2003; daSilva et al., 2004).
- 3) **Modelo híbrido:** en este modelo algunos de los ERES están continuamente asociados con el Golgi de manera similar a lo que ocurre con el modelo de unidad secretora, pero hay otros ERES que no lo están. Los ERES que no están asociados al Golgi son más pequeños y se mueven de manera independiente. Estos ERES inactivos se mantienen estables, activándose una vez se encuentran con el Golgi (Ito et al., 2014).
- 4) **Modelo unidad secretora modificada:** en este modelo, el aparato de Golgi se detiene momentáneamente en los ERIS (“ER Import Sites”), zonas del ER donde se propone que ocurre la fusión de las vesículas COPI. Las vesículas COPII y COPI se están formando continuamente durante el movimiento de Golgi, pero su fusión con la membrana diana solo ocurre cuando éste está totalmente detenido. Ambos tipos de vesículas se acumulan entre el Golgi y el ER, y se mueven conjuntamente con las cisternas de Golgi (Lerich et al., 2012).

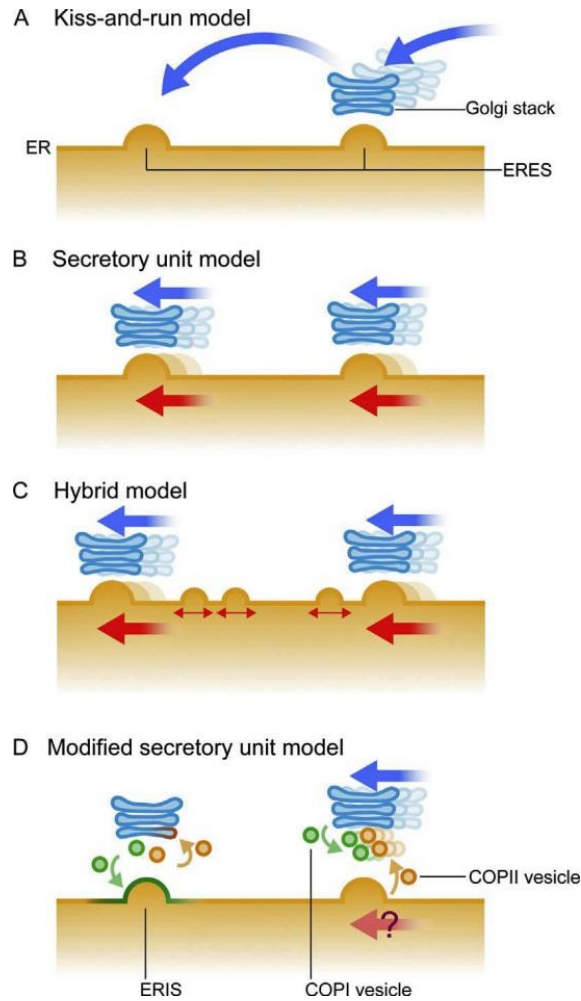


Figura 6. Modelos de transporte entre ER-Golgi (Ito et al., 2014). Representación de los cuatro modelos posibles para la conexión ERES-Golgi en plantas. A) Modelo “Kiss-and-run”; B) Modelo unidad secretora; C) Modelo híbrido; D) Modelo unidad secretora modificada.

Ninguno de los modelos ha sido aceptado en su totalidad. Actualmente, en plantas se considera que la relación entre ER y Golgi es tan estrecha debido bien a la existencia de conexiones tubulares entre ambos (conexión directa), o bien como consecuencia de la existencia de factores de adhesión (“tethering”) que se encargan de mantener esta estrecha relación (Yang et al., 2005; Hwang and Robinson, 2009).

Estas teorías son consistentes con el hecho de que las células vegetales presenten grandes vacuolas que ocupan casi la totalidad celular, dejando a ER y Golgi en un área muy reducida entre el tonoplasto y la membrana plasmática, estrechamente relacionados, siendo de este modo innecesario la existencia de un compartimento intermedio como el ERGIC para cubrir el transporte a distancias más largas, como ocurre en células de mamíferos (Brandizzi and Barlowe, 2013).

2.2. TRANSPORTE A LA MEMBRANA PLASMÁTICA/SUPERFICIE CELULAR

El tráfico de proteínas solubles desde el ER hacia la superficie celular podría tratarse de una ruta por defecto: solo es necesario que se cumpla un requisito, la proteína debe poseer un péptido señal situado en el extremo N-terminal para que se produzca su translocación a través de la membrana del ER. Este proceso se observa para muchas enzimas solubles, así como para la proteína fluorescente verde, GFP (“Green fluorescent protein”). La ausencia de una secuencia señal para el tráfico hacia vacuola es indispensable para la secreción de proteínas solubles. Este hecho está en concordancia con la consideración de la vía secretora como una vía por defecto (Park and Jurgens, 2012).

El transporte a la membrana plasmática de proteínas de membrana está menos caracterizado. Las proteínas de membrana con un solo dominio transmembrana parecen alcanzar su destino a través de la vía secretora dependiendo de la longitud de su región hidrofóbica: proteínas con un dominio transmembrana corto son retenidas en las cisternas del aparato de Golgi, mientras que si este dominio transmembrana es más largo, la proteína se transporta hacia la membrana plasmática (Brandizzi et al., 2002). Esta situación parece ser diferente en otros casos como son proteínas de membrana que tienen múltiples dominios transmembrana o con proteínas de membrana que presentan una región hidrofóbica de anclaje como ocurre con las proteínas SNARE (Park and Jurgens, 2012).

2.3. SECRECIÓN NO CONVENCIONAL

Alternativamente a la ruta de secreción convencional, seguida por proteínas que contienen un péptido señal, se ha identificado la existencia de una ruta de secreción no clásica en plantas y en animales en la que no participa el complejo de Golgi. Las proteínas que no poseen un péptido señal y siguen esta vía no convencional son conocidas como proteínas LSP (Proteínas de secreción sin secuencia señal, “leaderless secretory proteins”), y suponen alrededor del 50% de las proteínas del secretoma de plantas.

Aunque la vía de secreción no convencional (UPS, “unconventional protein secretion”) ha sido caracterizada con más detalle en células de mamíferos y levaduras, ya existen ejemplos de este tipo de secreción en plantas. Proteínas relacionadas con la eliminación de patógenos parecen seguir esta vía, siendo la mayoría de ellas proteínas LSP. La secreción de ciertas proteínas citosólicas en *Arabidopsis thaliana*, tales como la manitol deshidrogenasa y la

higromicina fosfotransferasa, también parecen seguir una vía de secreción Golgi-independiente (Drakakaki and Dandekar, 2013).

Se ha identificado un nuevo orgánulo en *Arabidopsis* que participa en la vía de secreción no convencional. Se trata de un compartimento de doble membrana, caracterizado por la presencia de EXO70E2, una de las subunidades del complejo exocítico putativo de *Arabidopsis*. El complejo exocítico es un complejo conservado evolutivamente que se compone de ocho subunidades y actúa en dominios específicos de la membrana plasmática inhibiendo la fusión extensiva de vesículas exocíticas en mamíferos y levaduras.

Debido a la presencia de EXO70E2, este orgánulo fue llamado EXPO (“EXocyst Positive Organelle”) y participa en el tráfico de proteínas en la ruta de secreción Golgi-independiente (Wang et al., 2010; Ding et al., 2012). Mediante microscopía electrónica se ha visto que EXPO es un compartimento exocítico que se fusiona con la membrana plasmática y libera vesículas de membrana sencilla en el apoplasto (Figura 7) (Wang et al., 2010; Ding et al., 2012).

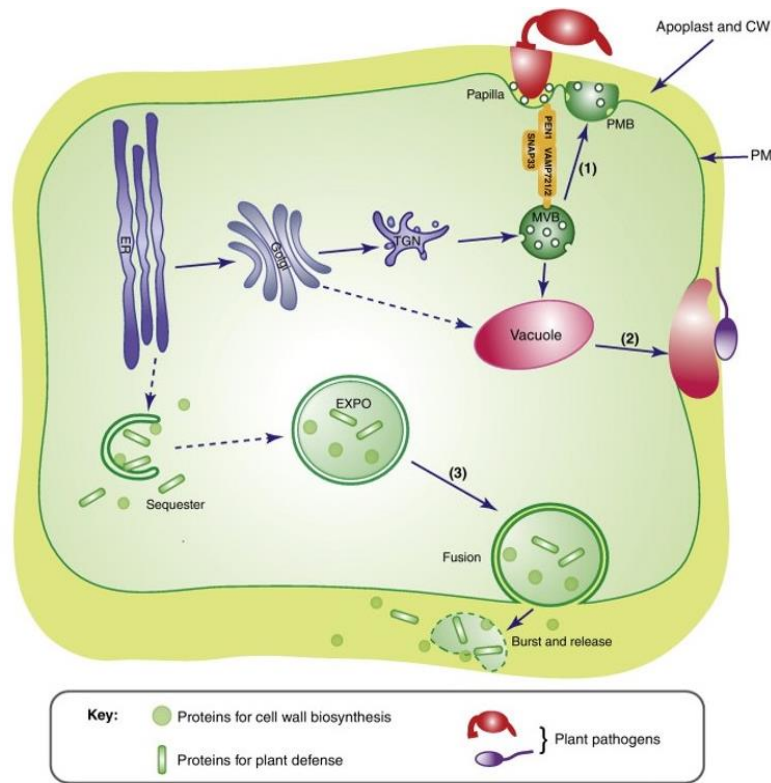


Figura 7. Secreción no convencional (UPS) (Ding et al., 2012). Modelo de vías de transporte en secreción de proteínas mediante UPS (“Unconventional Protein Secretion”) en células vegetales. Se ha visto que los MVBs (1) y las vacuolas (2) pueden fusionarse con la membrana plasmática en respuesta a un ataque por patógeno que podría resultar en la muerte celular. (3) Un nuevo orgánulo llamado EXPO podría también fusionarse con la membrana plasmática y liberar proteínas citosólicas que son importantes para la biosíntesis de la pared celular o para la defensa frente a patógenos (ver texto).

2.4. TRANSPORTE A VACUOLA

Las proteínas solubles recién sintetizadas que deben ser transportadas hacia la vacuola necesitan una secuencia señal o señal de clasificación en su extremo N- o C-terminal (VSS, “vacuolar sorting sequence/signal”). Las proteínas solubles que presentan esta señal se unen a receptores de clasificación vacuolares (VSR, “vacuolar sorting receptors”), que transportan a estas proteínas solubles hacia los cuerpos multivesiculares (MVBs, “multivesicular bodies”) o compartimento prevacuolar (PVC, “prevacuolar compartment”), que son funcionalmente equivalentes a los endosomas tardíos (LE, “late endosomes”) de células animales (Park and Jurgens, 2012).

En el modelo clásico, la salida de estas proteínas destinadas a vacuola se produce desde la red del *trans*-Golgi (TGN). Sin embargo, otros estudios sugieren que la clasificación de estas proteínas podría estar sucediendo ya en un paso más temprano (Niemes et al., 2010). De manera generalizada, se piensa que estas proteínas cargo solubles se liberan del receptor VSR al pH ácido de los MVBs/PVC. Mientras que las proteínas solubles son transportados hasta la vacuola mediante la fusión de estos MVBs/PVC con la vacuola, los receptores VSR son reciclados hacia el TGN a través de vesículas recubiertas de retrómero (Fuji et al., 2007; Craddock et al., 2008; Richter et al., 2009; Drakakaki and Dandekar, 2013).

Existen dos hipótesis para el tráfico de proteínas hacia la vacuola. La primera, la versión más clásica, implica que este transporte hacia vacuola está mediado por vesículas recubiertas de clatrina (CCVs, “clathrin-coated vesicles”), las cuales transportan la carga entre el TGN/EE (Endosomas tempranos, “Early endosomes”) y el MVB/PVC. Esta teoría está basada en que el receptor de clasificación vacuolar VSR1/ELP interactúa con la subunidad μ 1 del complejo adaptador AP-1 de mamíferos, y con la adaptina μ A de *Arabidopsis* en experimentos *in vitro*, ambos componentes de las CCVs (Sanderfoot et al., 1998; Ahmed et al., 2000). Sin embargo, esta teoría ha sido cuestionada debido al reciente descubrimiento de que la sobreexpresión transitoria de una cadena pesada truncada de clatrina (que funciona como un mutante dominante negativo) no interfiere con el tráfico hacia la vacuola, y que sería acorde con un modelo alternativo de maduración de los MVB (Scheuring et al., 2011). De hecho, existe actualmente una gran controversia en este campo (Robinson and Pimpl, 2014).

3. MECANISMOS MOLECULARES DEL TRANSPORTE A LO LARGO DE LA VÍA SECRETORA TEMPRANA

3.1. VESÍCULAS COPII

3.1.1. FORMACIÓN DE VESÍCULAS COPII

Sec 12, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF, "Guanine nucleotide Exchange Factor") asociado a membrana, localizado en la membrana del ER, activa la GTPasa citosólica Sar1 ("Secretion-associated, Ras-related protein 1"), favoreciendo el intercambio de GDP por GTP, para su transformación en la versión Sar1-GTP, que expone una hélice anfipática y se inserta en la membrana del ER. La localización de Sec12 en las membranas del ER garantiza que Sar1 sea reclutada exclusivamente en estas membranas. Sar1-GTP favorece el reclutamiento de la cubierta COPII, que está compuesta por complejos de heterodímeros Sec23-Sec24 y Sec13-Sec31. Sar1 recluta en primer lugar al dímero Sec23-Sec24, a través de su interacción con Sec23. A su vez, Sec24 puede interactuar con una gran variedad de cargos, de forma directa (proteínas de membrana) o indirecta (receptores de carga soluble). Esta interacción está mediada por señales de salida del ER, presentes en el dominio citosólico de proteínas de membrana (carga o receptores). Una vez unido, este dímero Sec23-24 forma un complejo de reclutamiento de carga que discrimina entre proteínas que se van a transportar y proteínas residentes en el ER. El heterodímero Sec23-Sec24 tiene forma de pajarita, con una superficie cóncava que contacta con la membrana y contribuye a introducir curvatura en la misma. Una vez reclutado el heterodímero Sec23-Sec24 y Sar1 (parte interna de la cubierta), se recluta el heterodímero Sec13-Sec31 (parte externa de la cubierta), que se une al complejo Sec23-Sec24 pero también interactúa con Sar1, completando así la cubierta COPII (Figura 8). Una vez formado el complejo, éste supone un andamio que da la curvatura necesaria para la formación de la vesícula. Una vez formada la vesícula, y tras separarse de la membrana dadora (en este caso la membrana del ER), la cubierta proteica de la vesícula debe ser eliminada para facilitar que la vesícula se fusione con la membrana diana (en este caso la membrana del aparato de Golgi). Este paso está inducido por la hidrólisis de GTP de Sar1, catalizada por Sec23, que actúa como una proteína activadora de la actividad GTPasa de Sar1, acelerada por Sec31, causando un cambio conformacional que permite que Sar1 se disocie de la membrana, dejando la vesícula descubierta, lista para su fusión con la membrana de Golgi, para así finalmente liberar la carga (Ver apartado 3.3. de la introducción).

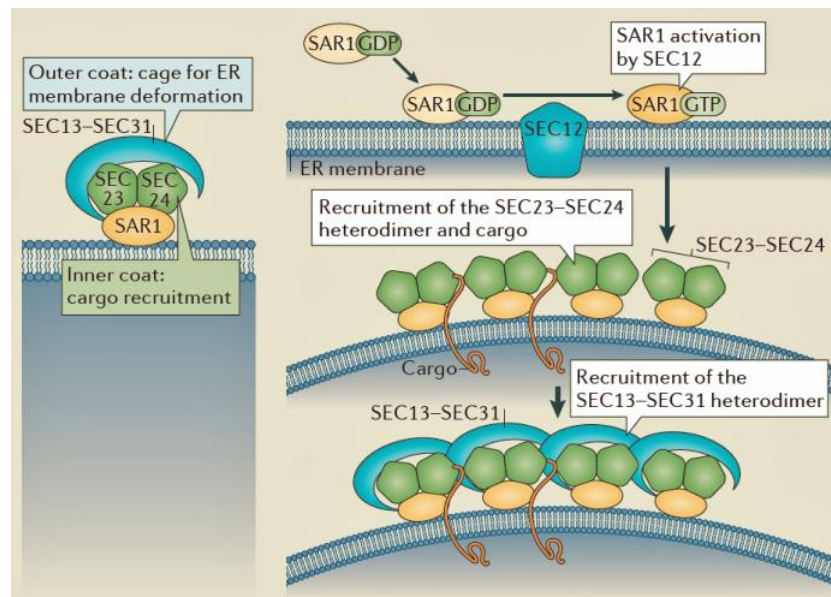


Figura 8. Formación de la cubierta de vesículas COPII (Brandizzi and Barlowe, 2013). El complejo proteico de cubierta conocido como COPII está formado por la GTPasa SAR1 (“secretion-associated RAS-related1”) y los dos subcomplejos SEC23-SEC24 y SEC13-SEC31 (panel de la izquierda). La activación de SAR1 está coordinada con la proteína SEC12, localizada en la membrana del ER, la cual produce la conversión de SAR1-GDP en SAR1-GTP. Esta forma activa se inserta en la membrana del ER, y favorece en un primer momento el reclutamiento del complejo SEC23-SEC24, a través de su interacción con SEC23, mientras que SEC24 se encarga del reconocimiento de posibles cargos. El proceso se completa con el reclutamiento del complejo SEC13-SEC31, a través de su interacción con SEC23 y SAR1. Una vez formado el complejo se produce una curvatura en la membrana que va a favorecer la creación de la vesícula naciente COPII, que lleva en su interior los cargos seleccionados (panel de la derecha).

La presencia de vesículas COPII en plantas es aún objeto de debate. Sin embargo, en *Arabidopsis* existen proteínas heterólogas para casi todas las componentes de la cubierta COPII, incluyendo la GTPasa Sar1 (3 isoformas en *Arabidopsis*) (Hanton et al., 2005) y de otras subunidades (7 para Sec23, 3 para Sec24, 2 para sec31 y 2 para sec13) (Brandizzi and Barlowe, 2013). Estructuras similares a vesículas COPII han resultado difíciles de encontrar mediante microscopía electrónica, aunque existen algunos ejemplos (Robinson et al., 2007; Langhans et al., 2012; Donohoe et al., 2013). Esta dificultad para observar las vesículas COPII en plantas podría deberse a su rápida cinética de formación y consumo en la interfase ER-Golgi.

3.1.2. OTROS COMPONENTES DE LAS VESÍCULAS COPII

Proteínas p24: estudios en animales y en plantas demuestran que las proteínas de la familia p24 pueden interactuar con las subunidades de la cubierta COPII, participando de este modo en el proceso de clasificación de proteínas en vesículas COPII y probablemente en su biogénesis. De hecho, las proteínas p24 poseen en su cola citosólica señales de unión a COPI y COPII (ver más adelante, sección 4 de la introducción).

Fosfolipasa D (PLD): se ha demostrado que la proteína Sar1 activa a la PLD. Una vez activada, la PLD se concentra en los ERES y contribuye a la deformación de la membrana y al reclutado de Sec23-Sec24.

PI(4)P (Fosfatidilinositol-4-fosfato): se ha observado que los ERES están enriquecidos en el lípido PI(4)P, jugando un papel fundamental en la deformación de la membrana necesaria para la formación de la vesícula.

3.1.3. SEÑALES DE CLASIFICACIÓN EN VESÍCULAS COPII

Aunque la secreción de proteínas y la salida de proteínas solubles desde el ER se cree que ocurre mayoritariamente por defecto, estudios en células de mamíferos han mostrado que ciertas proteínas de membrana son seleccionadas de forma específica para incorporarse en vesículas COPII, concentrándose en dominios específicos del ER conocidos como ERES. Señales en la cola citosólica de proteínas transmembrana podrían mediar en el reclutamiento de las subunidades COPII a la membrana del ER, actuando como “señales de clasificación” en vesículas COPII. No está claro si este mismo mecanismo opera en células vegetales, aunque el alto grado de homología entre los componentes de la cubierta COPII de plantas con otros sistemas sugiere que las señales implicadas deben ser similares.

Se han descrito dos tipos de señales que se encuentran en los dominios citosólicos de dichas proteínas implicadas en esta interacción: un motivo di-acídico (EXD, EXE) o un motivo di-hidrofóbico ($\phi\phi$, FF). Más recientemente se ha descubierto un nuevo motivo di-básico ([RX](X)[RX]) que también puede actuar como señal de clasificación en vesículas COPII (Tabla 1). Finalmente, se han descrito otros motivos implicados en la clasificación de proteínas SNARE (Mossesso et al., 2003).

SEÑAL DE CLASIFICACIÓN	PROTEÍNA	SUBUNIDAD DE INTERACCIÓN	REFERENCIAS
Motivos di-ácidos (EXD/EXE)			
Y <u>T</u> D <u>I</u> E <u>M</u> N <u>R</u> L <u>G</u> K (-1)	VSV-G	Sin determinar	(Nishimura and Balch, 1997; Sevier et al., 2000)
AN <u>S</u> F <u>C</u> Y <u>E</u> NE <u>V</u> AL (-45)	Kir2.1	Sin determinar	(Ma et al., 2001)
Q <u>S</u> P <u>I</u> Q <u>L</u> K <u>D</u> L <u>E</u> S <u>Q</u> I (-1)	Sys1p	Sec23/24	(Votsmeier and Gallwitz, 2001)
AE <u>K</u> M <u>D</u> I <u>D</u> T <u>G</u> R (-34)	Gap1p	Sar1; Sec23/24	(Malkus et al., 2002)
Motivos di-hidrofóbicos			
Y <u>I</u> M <u>Y</u> R <u>S</u> Q <u>Q</u> E <u>A</u> A <u>A</u> K <u>K</u> F <u>F</u> (-1)	ERGIC-53	Sec23/24	(Kappeler et al., 1997)
<u>Y</u> <u>Y</u> M <u>F</u> R <u>I</u> N <u>Q</u> D <u>I</u> K <u>V</u> K <u>L</u> L (-1)	Emp46p	Sec23/24	(Sato and Nakano, 2002)
R <u>R</u> E <u>F</u> F <u>E</u> V <u>T</u> S <u>L</u> V (-1)	Emp24p	Sec13/31 > Sar1 > Sec23/24	(Belden and Barlowe, 2001)
K <u>N</u> Y <u>F</u> K <u>T</u> K <u>H</u> I <u>I</u> (-1)	Erv25p	Sec13/31 > Sec23/24	(Belden and Barlowe, 2001)
Y <u>L</u> R <u>R</u> F <u>F</u> E <u>K</u> A <u>K</u> K <u>L</u> I <u>E</u> (-1)	p23	Sec23/24	(Dominguez et al., 1998)
Y <u>L</u> K <u>R</u> F <u>F</u> E <u>V</u> R <u>R</u> V <u>V</u> (-1)	p24	Sec23/24	(Dominguez et al., 1998)
Y <u>L</u> K <u>R</u> Y <u>F</u> H <u>K</u> K <u>K</u> L <u>I</u> (-1)	Atp24	Sec23/24	(Contreras et al., 2004b)
Y <u>Q</u> P <u>D</u> D <u>K</u> T <u>K</u> G <u>I</u> L <u>D</u> R (-1)	Erv41p	Sar1; Sec23/24	(Otte and Barlowe, 2002)
K <u>L</u> F <u>Y</u> K <u>A</u> Q <u>R</u> S <u>I</u> W <u>G</u> K <u>K</u> S <u>Q</u> (-1)	Erv46p	Sar1; Sec23/24	(Otte and Barlowe, 2002)
Motivos di-básicos ([RK](X)[RK])			
(1) M <u>L</u> Q <u>W</u> R <u>R</u> R <u>R</u> H <u>C</u> C <u>F</u> A <u>K</u> M	b1,3GalT2	Sar1	(Giraud and Maccioni, 2003)
(1) M <u>K</u> S <u>R</u> G <u>R</u> F <u>G</u> W <u>W</u> S <u>V</u> R	Tobacco prolyl hydroxylase	Sin determinar	(Yuasa et al., 2005)
Otros motivos			
Y <u>N</u> N <u>S</u> N <u>P</u> F	Sed5 (SNARE)	Sec24	(Mossesso et al., 2003)
L <u>x</u> x <u>M</u> E	Bet1p, Bos1p y Sed5 (SNAREs)	Sec23/24	(Mossesso et al., 2003)

Tabla 1. Señales de clasificación para inclusión en vesículas COPII. A) Motivos di-ácidos (EXD/EXE); B) Motivos di-hidrofóbicos ($\phi\phi$, FF); C) Motivos di-básicos ([RX](X)[RX]); D) Otros motivos (implicados en la clasificación de proteínas SNARE).

3.2. VESÍCULAS COPI

3.2.1. FORMACIÓN DE VESÍCULAS COPI

La cubierta COPI está formada por un complejo heptamérico formado por las subunidades (α , β , β' , γ , δ , ϵ y ζ -COP), también conocido como Coatómero. Este complejo o coatómero está formado a su vez por dos subcomplejos: un complejo tetramérico (también conocido como F-COP), compuesto por γ -COP- δ -COP- ζ -COP- β -COP, que forman la capa interna, en contacto con la membrana y que se encargan de la selección de carga, y un complejo trimérico (también conocido como B-COP) compuesto por α -COP- β' -COP- ϵ -COP, que forman la capa externa y que está implicado en la polimerización de la cubierta.

Cuando la GTPasa ARF1 (Factor de ribosilación del ADP 1, “ADP-Ribosylation Factor 1”) es activada, mediante el intercambio de GDP por GTP, ARF1 pasa a su forma activa ARF1-GTP. Esta activación se produce gracias a proteínas GEF (ARF1-GEFs), que son factores intercambiadores de nucleótidos. Este proceso es muy similar al que ocurre con la GTPasa Sar1 (y su GEF Sec12) en la formación de vesículas COPII. Una vez activa ARF1, se produce un cambio conformacional que permite una interacción directa de ARF1 con la membrana del Golgi. Una vez insertado en la membrana, el ARF1 activado procede al reclutamiento de las subunidades COPI presentes en el citosol. A diferencia de las cubiertas de clatrina y COPII, que presentan dos capas (externa e interna) que se reclutan de forma secuencial, el coatómero se recluta en bloque (en una sola etapa) (Hara-Kuge et al., 1994; Rothman and Wieland, 1996). Este reclutamiento y formación de la cubierta produce una curvatura en la membrana, resultando en la formación de una vesícula naciente COPI que se separa de la membrana (Figura 9).

El desensamblaje de las proteínas de cubierta COPI es necesario para una correcta fusión con la membrana del ER y requiere la hidrólisis del GTP de ARF1. Este proceso de hidrólisis del GTP de ARF1 está mediado por proteínas ARF1-GAPs, presentes tanto en mamíferos como en plantas, que poseen un dominio catalítico conservado.

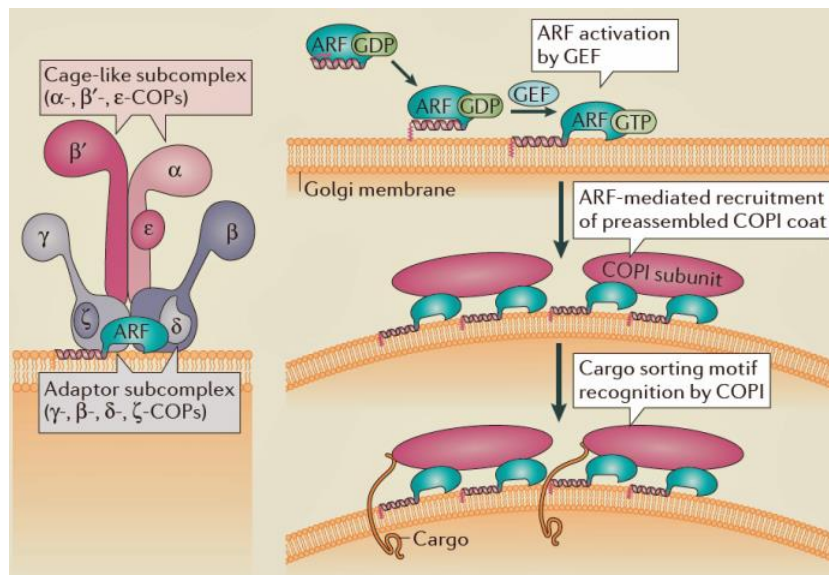


Figura 9. Formación de la cubierta de vesículas COPI (Brandizzi and Barlowe, 2013). El complejo proteico de cubierta conocido como COPI o Coatómero está formado por un complejo heptamérico conteniendo las subunidades (α, β, β', γ, δ, ε y ζ), dividido en dos subcomplejos: el subcomplejo F (γ, δ, ζ, β) en contacto con la membrana, que se encarga del reconocimiento del cargo; y el subcomplejo B (α, β', ε) en la parte externa y que se encarga de la polimerización de la cubierta (panel izquierdo). La proteína ARF1 pasa de su forma inactiva ARF1-GDP a su forma activa ARF1-GTP gracias a la actividad de proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina (GEFs). Una vez activa, la proteína ARF1-GTP facilita el reclutamiento del coatómero en un solo bloque, produciéndose el reconocimiento de los posibles cargos que van a incluirse en las vesículas COPI.

Mientras que *Saccharomyces cerevisiae* solo contiene una copia de cada una de las subunidades que forman la cubierta COPI, en vertebrados se ha descubierto dos versiones para las subunidades γ -COP y ζ -COP, llamadas γ_1 y γ_2 y ζ_1 y ζ_2 . Esto permitiría formar diferentes combinaciones que pueden dar lugar a complejos COPI alternativos (Tabla 2) (Gao et al., 2014).

En *Arabidopsis* se han encontrado más versiones alternativas para estas subunidades del coatómero: dos versiones para α -COP, β -COP y ε -COP; tres versiones para β' -COP y ζ -COP; y una única copia para δ -COP y γ -COP (Tabla 2) (Gao et al., 2014). La existencia de varias versiones distintas para una misma subunidad sugiere que en plantas se pueden formar combinaciones más complejas de cubiertas COPI, que podrían ser responsables de la formación de diferentes subpoblaciones de vesículas COPI. Además, se ha observado que entre las siete subunidades que forman COPI, las subunidades α -COP, β' -COP, δ -COP y γ -COP pueden interactuar con señales de clasificación localizadas en el dominio citosólico de cargos y mediar en su incorporación en las vesículas COPI que se están formando.

Organismo	α -COP	β -COP	β' -COP	δ -COP	ε -COP	γ -COP	ζ -COP
Sc	Ret1	Sec26	Sec27	Ret2	Sec28	Sec21	Ret3
Hs	α	β	β'	δ	ε	γ_1 γ_2	ζ_1 ζ_2
At	At1g62020 At2g21390	At4g31480 At4g31490	At1g52360 At3g15980 At1g79990	At5g05010	At2g34840 At1g30630	At4g34450	At1g60970 At3g09800 At1g08520

Tabla 2. Las subunidades COPI en plantas tienen una alta diversidad de isoformas (Gao et al., 2014). Sc, *Saccharomyces cerevisiae* presenta solo una isoforma para cada una de las siete subunidades. Hs, *Homo sapiens*, presenta dos isoformas para las subunidades γ -COP y ζ -COP, y solo una isoforma para el resto de subunidades. At, *Arabidopsis thaliana*, presenta tres isoformas para las subunidades β' -COP y ζ -COP; dos isoformas para las subunidades α -COP, β -COP y ε -COP; y sólo una isoforma para las subunidades δ -COP y γ -COP.

En mamíferos se han identificado diferentes subpoblaciones de vesículas COPI dependiendo de sus cargas y sus factores de adhesión. En plantas, estudios recientes de tomografía electrónica en *Arabidopsis* y en células de alga han establecido dos tipos de vesículas COPI, llamadas vesículas COPIa y vesículas COPIb. Las vesículas COPIa, con un contenido claro, se forman exclusivamente en la región *cis*-Golgi, y se localizan únicamente entre la región ER-Golgi. Sin embargo, las vesículas COPIb, con un contenido oscuro, se forman

exclusivamente en las regiones del *medial-* y *trans-*Golgi, confinadas únicamente en las regiones que confieren estas cisternas (Gao et al., 2014).

Las diferencias en su localización y en la coloración aparente de estas vesículas sugieren que las vesículas COPIa y COPIb podrían albergar diferentes cargos y mediar en diferentes transportes retrógrados. De esta manera las vesículas COPIa podrían ser las encargadas de los procesos de retención de proteínas residentes en el ER, y las vesículas COPIb podrían encargarse de los procesos de transporte retrógrado (*trans-cis*) intra-Golgi de proteínas residentes en Golgi.

Sin embargo, los mecanismos subyacentes por los cuales las diferentes subpoblaciones de vesículas COPI reconocen diferentes señales de clasificación y median en la compartimentalización de las proteínas de membrana a lo largo de la vía secretora temprana de plantas aún está por esclarecer.

3.2.2. OTROS COMPONENTES DE LAS VESÍCULAS COPI

Proteínas p24: El factor citosólico ARF1 en su forma ARF1-GDP inactiva, se une a dímeros de proteínas de la familia p24, presentes en la membrana del ER tanto en animales (Popoff et al., 2011), como en plantas (Contreras et al., 2004a). Esta unión sirve como fijación de ARF1, para su correcta conversión a ARF1-GTP (forma activa), gracias a factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), tales como GBF1 o BIGs, comenzando de este modo el reclutamiento de la cubierta COPI. De hecho, ARF1-GTP interacciona directamente con el coatómero, tanto en animales (Popoff et al., 2011), como en plantas (Contreras et al., 2004a).

GTPasas Rab1 y PI(4)P: El reclutamiento de los ARF1-GEFs sigue un mecanismo poco conocido que podrían implicar a las GTPasas Rab1 y PI(4)P.

El coatómero o cubierta COPI, interacciona con ARF1 (4 moléculas de ARF1 –2 dímeros– unen 1 molécula de coatómero), con las proteínas p24 (a través de sus señales de clasificación en la cola citoplasmática) y con otros tipos de carga. Por tanto, las proteínas p24 participan en la biogénesis de las vesículas COPI, tanto en animales (Popoff et al., 2011), como en plantas (Contreras et al., 2004a).

3.2.3. SEÑALES DE CLASIFICACIÓN EN VESÍCULAS COPI

Hasta el momento, se han identificado dos clases distintas de señales de inclusión en vesículas COPI: las señales de retención en ER y las señales de retención en Golgi (Tabla 3).

Las **señales de retención en el ER** están presentes en proteínas que normalmente residen en el ER y que van a ser recuperadas desde el *cis*-Golgi. Estas proteínas son incluidas en vesículas COPIa en el lumen de la región del *cis*-Golgi para ser transportadas al ER. Existen distintas señales para la inclusión en vesículas COPIa: motivos de di-lisina en el extremo C-terminal, motivos de pentapéptidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal y motivos basados en arginina en el extremo N-terminal (Tabla 3) (Gao et al., 2014).

Las **señales de retención en Golgi** están presentes en proteínas residentes en el aparato de Golgi y que van a ser transportadas de manera retrógrada entre las cisternas del aparato de Golgi (en dirección *trans-cis*), mediante su inclusión en vesículas COPIb. Hasta el momento solo se ha descubierto un motivo KXD/E en el extremo C-terminal presente en la familia de proteínas EMP de *Arabidopsis*, humanos y *Saccharomyces cerevisiae* que es necesario y suficiente para su inclusión en vesículas COPIb (Tabla 3) (Gao et al., 2014).

Función	Señal de clasificación	Proteína	Organismo	Extremo Ct (-X) ó Nt (X-)	Referencias
Retención en ER	Motivo de di-lisina en extremo C-terminal: -KXXX, -KXXXX, -KK	Cf-9	<i>Lycopersicon esculentum</i>	-TKMKKH <u>K</u> KRY	(Benghezal et al., 2000)
		Proteínas p24δ: p24δ3-p24δ11	<i>Arabidopsis thaliana</i>	- <u>K</u> KXX	(Chen et al., 2012; Montesinos et al., 2012; Montesinos et al., 2013)
		FAD3	<i>Brassica napus</i>	-VYASD <u>K</u> SKIN	(McCartney et al., 2004)
		GPAT8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-KVESINNT <u>K</u> K	(Gidda et al., 2009)
	Motivo pentapéptido hidrofóbico en extremo C-terminal: f-X-X-K/R/D/E-f	GPAT9	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-ESILAR <u>L</u> EEK	(Gidda et al., 2009)
		FAD2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-KGVYWY <u>N</u> NKL	(McCartney et al., 2004)
	Motivos basados en arginina en extremo N-terminal: RXR	GCS1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	MTGASRRSAR <u>G</u> R-	(Boulaflous et al., 2009)
Retención en Golgi	Motivos KXD/E en extremo C-terminal	Familia proteínas EMP: EMP1-EMP12	<i>Arabidopsis thaliana</i>	EMP1-5 y 7: - <u>K</u> ID	(Gao et al., 2012)
				EMP6: - <u>K</u> LD	
				EMP8-10: - <u>K</u> CE	
				EMP11: - <u>K</u> LE	
				EMP12: - <u>K</u> CD	
	TM9SF1-TM9SF4	<i>Homo sapiens</i>	TM9SF1: - <u>K</u> MD	(He et al., 2009; Lozupone et al., 2009)	
			TM9SF2: - <u>K</u> VD		
			TM9SF3-4: - <u>K</u> ID		
TMN1/TMN2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TMN1: - <u>K</u> VD	(Aguilar et al., 2010)		
		TMN2: - <u>K</u> VE			

Tabla 3. Señales de clasificación para inclusión en vesículas COPI (Gao et al., 2014). Existen dos tipos de señales de inclusión en vesículas COPI: A) Señales de retención en el ER, presentes en proteínas que van a ser recuperadas desde Golgi hacia el ER. Actualmente se han identificado tres tipos de señales de inclusión en vesículas COPIa: motivo de di-lisina en C-terminal, motivo pentapéptido hidrofóbico en el extremo C-terminal y motivos basados en arginina en el extremo N-terminal. B) Señales de retención en Golgi, presentes en proteínas residentes en regiones de Golgi, siendo transportadas desde regiones más distales de Golgi, a regiones más proximales. Hasta el momento estos motivos de inclusión en vesículas COPIb están basados en secuencias KXD/E localizadas en el extremo C-terminal de las proteínas.

En el caso del receptor K/HDEL (ERD2) de mamíferos, posee una secuencia -KKXSXXX en su extremo C-terminal que podría facilitar su inclusión en vesículas COPI (COPIa). Sin embargo esto solo ocurre cuando la serina 209 está fosforilada (Cabrera et al., 2003). Por el contrario,

en las proteínas ERD2a y ERD2b de *Arabidopsis*, esta serina se localiza en una región más corriente arriba que lo que ocurre en mamífero y no hay evidencias de que pueda fosforilarse (ver más adelante, sección 5 de la introducción).

Las enzimas de glicosilación del complejo de Golgi no poseen señales de clasificación conocidas, pero se ha propuesto que podrían interactuar con proteínas adaptadoras para su inclusión en vesículas COPI (Gao et al., 2014).

3.3. FUSIÓN DE VESÍCULAS EN LA INTERFASE ER-GOLGI

La direccionalidad y fidelidad de la fusión de las vesículas de COPII y COPI con sus respectivas membranas u orgánulos diana está mediada por la acción concertada de GTPasas de la familia Rab, Factores de Adhesión (“tethering”) y por proteínas SNARE.

3.3.1. GTPasas DE LA FAMILIA RAB

Las GTPasas de la familia Rab constituyen una familia de proteínas que determinan la identidad de las membranas, así como el direccionamiento de las vesículas hacia la membrana diana con la que deben fusionarse. Estas Rab GTPasas están implicadas en la vía secretora temprana, en la organización de los endosomas, en la citoquinesis y en el tráfico post-Golgi hacia la membrana plasmática y hacia la vacuola (Woollard and Moore, 2008).

Las GTPasas están sometidas a un ciclo bien regulado entre su forma Rab-GDP y su forma Rab-GTP. Normalmente las Rab GTPasas se encuentran en su forma GDP en el citoplasma, unidas a una proteína conocida como RabGDI (inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina, “GDP-displacement inhibitor”), que enmascara dos cadenas de prenilo de las proteínas Rab, manteniéndolas en su forma inactiva. Para ejercer su función, las Rab GTPasas deben encontrarse unidas a la membrana dadora y además estar en su forma activa. El reclutamiento a la membrana requiere un desplazamiento de la proteína GDI por una proteína GDF (Factor desplazador de GDI, “GDI-displacement factor”) que deja las dos cadenas de prenilo de la Rab-GTPasa libres, facilitando su inserción en la membrana. Además se requiere una activación inmediata, pasando a su forma Rab-GTP activa, gracias a proteínas GEF que produce el intercambio de la forma Rab-GDP en su forma Rab-GTP, que es la forma activa. Las actividades realizadas por GDF y por GEF pueden encontrarse a menudo en una misma proteína (Woollard and Moore, 2008).

Una vez la vesícula llega y se fusiona con la membrana diana, gracias a que la Rab-GTP ha sido reconocida por los efectores rab adecuados (apartado 3.3.2.), proteínas GAP estimulan la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rab, permitiendo que estas vuelvan a su forma Rab-GDP inactiva, que es captada de nuevo por proteínas GDI, dejando la membrana y pasando de nuevo al citosol.

En plantas superiores solo existe una única familia de Rab GTPasas, reflejando de este modo la especificidad de los procesos de tráfico en células vegetales. En *Arabidopsis* existen 57 secuencias que codifican para proteínas Rab, las cuales se pueden dividir en 8 clados (RAB-A – RAB-H) y que forman la base de la nomenclatura sistemática para las Rabs de plantas. Cada una de estos 8 clados de *Arabidopsis* está relacionado con alguna Rab de mamíferos. En plantas, en las etapas tempranas de la ruta biosintética hacia el aparato de Golgi participan específicamente miembros de los clados Rab-D y Rab-B (Woollard and Moore, 2008).

3.3.2. FACTORES DE ADHESIÓN (“TETHERING FACTORS”)

Para que se produzca una correcta fusión entre una vesícula y su membrana aceptora o diana, debe existir una cooperación entre la Rab-GTP activa presente en la vesícula y factores efectores presentes en la membrana diana, que normalmente son factores de adhesión, y que van a reconocer a las Rab-GTP presentes en las vesículas. Una vez producido este reconocimiento, las vesículas se aproximan a la membrana diana hasta una distancia que permite la interacción entre las proteínas SNARE que conduce a la fusión de membranas (Figura 10).

En general, se consideran estos factores de adhesión como puentes de unión entre membranas, debido a su unión con las Rab-GTPasas así como a las proteínas SNARE, como mecanismo de preparación de fusión de membranas. Existen dos clases de factores de adhesión bien caracterizados en eucariotas: las proteínas “coiled-coil” y los complejos de proteínas de unión formados por multisubunidades (Brockner et al., 2010).

En células de mamíferos, el direccionamiento vesicular depende de la GTPasa RAB1 y de factores de adhesión de la clase “coiled-coil”, como son el factor p115, GM130 (130 kDa) y GRASP65 (65 kDa); y de un complejo de adhesión formado por multisubunidades de 170 kDa conocido como TRAPPI (“transport protein particle I”). En plantas, aparentemente no existen homólogos de las proteínas GRASP65 y GM130 de mamíferos. Sin embargo, se ha visto que sí requieren de un homólogo de p115 para el transporte ER-Golgi y expresan otras proteínas localizadas en Golgi con identidad de secuencia a TRAPPI (Ito et al., 2014). La existencia de un

conjunto más amplificado de factores de adhesión podría estar relacionado con la estrecha unión entre ER y Golgi en plantas. Por otra parte, la ausencia de homólogos de GM130 en plantas sugiere que la adquisición o pérdida de factores de adhesión específicos podría estar contribuyendo a la organización única del complejo de Golgi en plantas durante la evolución desde el último ancestro eucariota (Ito et al., 2014).

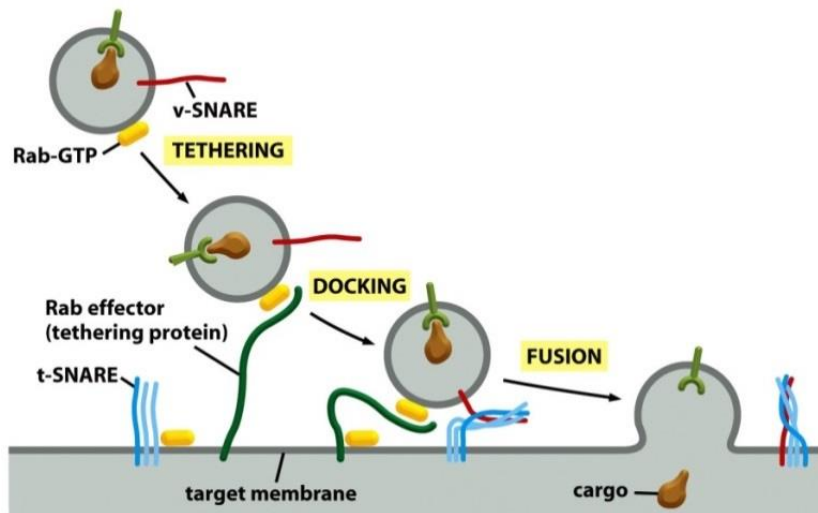


Figura 10. Proceso de fusión de una vesícula con la membrana mediado por Rab GTPasas, factores de adhesión y proteínas SNARE (Alberts et al., 2008). La Rab-GTP en su forma activa presente en la vesícula es reconocida por factores de adhesión localizados en el orgánulo aceptor, que actúan como efectores Rab, y que aproximan la vesícula a la membrana diana. A continuación, la proteína SNARE de la vesícula interacciona con las tres proteínas SNARE de la membrana diana, formando un tetrámero, y completando el proceso de fusión de membranas, liberando el contenido de la vesícula al interior del orgánulo diana.

3.3.3. PROTEÍNAS SNARE

Varias proteínas están involucradas en el acoplamiento y fusión de vesículas en el reconocimiento de membrana diana y su correcta fusión de membranas en ella. Entre las proteínas que participan en el tráfico vesicular, las proteínas SNARE (“Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein Attachment protein REceptors”) se han descrito como proteínas con un papel crítico en la fusión de membranas. Una vez se ha producido el reconocimiento entre la Rab-GTP de la vesícula y los factores efectores o de adhesión en la membrana diana, se establece el escenario perfecto para que se produzca el reconocimiento entre las proteínas SNARE presentes en la vesícula y la membrana diana, y que desembocara en la fusión definitiva entre ambas membranas (Figura 10).

Las proteínas SNARE pueden clasificarse en dos tipos: v-SNARE (SNAREs de la Vesícula) y t-SNARE (SNAREs en la membrana diana, "Target") (Kim and Brandizzi, 2012). Cuando una vesícula se acerca a su membrana diana, una proteína v-SNARE de la vesícula interactúa con tres t-SNAREs de la membrana diana, formando un complejo hetero-tetramérico *trans*-SNARE que conduce la fusión de membranas. Las proteínas SNARE pueden dividirse a su vez en 4 clases, atendiendo a los aminoácidos presentes en su motivo SNARE: Qa-, Qb-, Qc- y R-SNARE.

En mamíferos, un complejo SNARE típico consiste en Qa-, Qb- y Qc-SNARE en la membrana diana, y una R-SNARE en la vesícula. La misma combinación se ha conservado también en plantas. Se han descubierto más de 65 proteínas SNARE en *Arabidopsis*, más del doble de proteínas SNARE distintas que en sistemas unicelulares o en mamíferos. Este elevado número podría estar relacionado con la complejidad del tráfico de membranas en plantas.

SNAREs del ER y Golgi

En el ER y en el Golgi se han localizado 21 SNAREs distintas a nivel subcelular mediante microscopia con proteínas de fusión fluorescentes. De manera general, una Qa-SNARE es el núcleo que regula la formación del complejo SNARE en la membrana diana. Muchos mutantes nulos para Qa-SNARE han resultado ser letales, sugiriendo que las Qa-SNARE son esenciales. Se ha demostrado que dos proteínas Qa-SNARE, AtSYP81 y AtSYP31, intervienen en el tráfico ER-Golgi. Al utilizar marcadores de secreción y de retención en ER se observó que la sobreexpresión de AtSYP81 inhibía tanto el transporte anterógrado (ER-Golgi) como el retrógrado (Golgi-ER), mientras que la sobreexpresión de AtSYP31 solo inhibía el tráfico anterógrado (Kim and Brandizzi, 2012).

Se ha demostrado además que Sec24a y Sec24b, componentes de la maquinaria COPII en mamíferos, interactúan directamente con Sec22p (SNARE de levadura). En plantas, se ha observado que mutantes *atsec22* (R-SNARE) muestran alteraciones en la morfología del aparato de Golgi, causando la retención en ER de una SNARE de membrana plasmática en polen (El-Kasmi et al., 2011). La interacción entre las proteínas de cubierta y las SNARE aún no ha sido demostrada en plantas.

4. PROTEINAS p24

Las proteínas p24 constituyen una familia de proteínas de membrana de tipo I, de pequeño tamaño, alrededor de 20-25 kDa, cuyos miembros se localizan principalmente en los compartimentos de la vía secretora temprana y en vesículas recubiertas por COPI y por COPII, sugiriendo de este modo un papel fundamental de estas proteínas en el correcto funcionamiento del transporte de proteínas en la vía secretora temprana (Strating et al., 2009; Dancourt and Barlowe, 2010).

4.1. ESTRUCTURA

Todas las proteínas p24 comparten una misma topología. Están formadas por un dominio luminal de unos 180 aminoácidos, el cual incluye un dominio GOLD (“GOLgi Dynamics”, así denominado por su presencia en varias proteínas implicadas en la Dinámica del GOLgi) y un dominio “Coiled-Coil” (CC) de interacción entre proteínas (Figura 11).

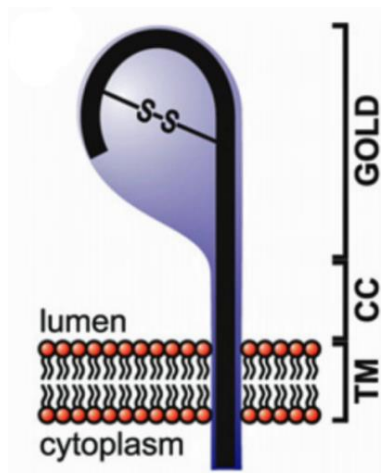


Figura 11. Estructura de las proteínas de la familia p24 (Strating and Martens, 2009). Las proteínas p24 incluyen un dominio GOLD, una región “coiled-coil” (CC), una región transmembrana (TM) y una cola citoplasmática.

El **dominio GOLD** podría estar implicado en interacciones específicas proteína-proteína, en particular en la interacción con proteínas que actúen como cargos putativos en el transporte entre ER y Golgi (Anantharaman and Aravind, 2002; Carney and Bowen, 2004).

El **dominio “Coiled-Coil”** de las proteínas p24 permite interacciones intermoleculares entre copias de la misma proteína, así como entre distintas proteínas p24. De hecho, la oligomerización está vinculada al transporte ER-Golgi y además es requerida para la correcta localización de las proteínas p24 (Fullekrug et al., 1999; Gommel et al., 1999; Ciuffo and Boyd, 2000; Emery et al., 2000; Jenne et al., 2002; Langhans et al., 2008).

Además, las proteínas p24 contienen un único **dominio transmembrana** (que parece reconocer a un solo tipo de esfingolípidos) y un **dominio citosólico** C-terminal corto (12-18 aminoácidos), que contiene señales de unión para COPI y COPII (Strating et al., 2009) (Apartados 3.1.3 y 3.2.3)(Fig 11 y 15).

En base a esta topología, se ha propuesto que estas proteínas podrían actuar en la membrana de origen como receptores de carga soluble, a través del dominio GOLD en su parte luminal, participando así en la clasificación de las proteínas solubles que deben ser incluidas en la vesícula y reclutando las cubiertas COPI o COPII a través de señales de clasificación (“sorting”) en su cola citosólica (CT) (Figura 12) (Strating et al., 2009). Las proteínas p24 pueden formar complejos hetero-oligoméricos (a través de sus dominios “coiled-coil”). Esta oligomerización permite entrecruzar proteínas p24 conteniendo señales de transporte retrógrado y anterógrado, dándoles por tanto la capacidad de ciclar entre ER y Golgi (Emery et al., 2000; Strating et al., 2009).

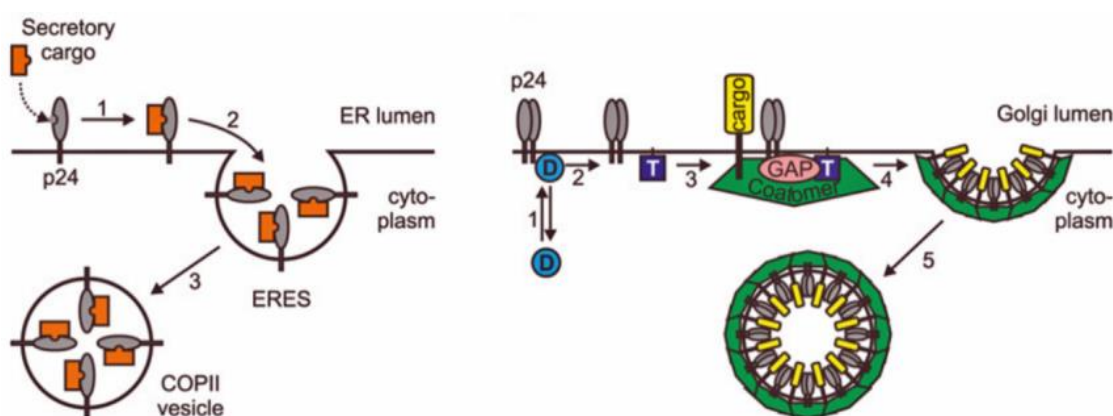


Figura 12. Modelos de funcionamiento de las proteínas p24 en vesículas COPII y COPI (Strating and Martens, 2009).

A: Representación esquemática de la participación de proteínas p24 en el transporte anterógrado (ER-Golgi). Las proteínas p24 actúan como receptores de moléculas solubles presentes en el lumen del ER y que van a incluirse en vesículas COPII que se están formando en los ERES. Una vez formada la vesícula se transporta hacia el Golgi, donde las proteínas p24 liberarán la carga.

B: Representación esquemática de la participación de proteínas p24 en el transporte retrógrado (Golgi-ER). La cola citoplasmática de las proteínas p24 actúa como receptor de moléculas ARF1-GDP. Una vez que las moléculas ARF1-GDP pasan a su forma activa ARF1-GTP se disocian de las proteínas p24 y se insertan en la membrana. Las proteínas p24 sirven como un punto de anclaje para la formación de vesículas COPI, reclutando y regulando la actividad de la GTPasa ARF-GAP1, que es esencial para la selección y reclutamiento de moléculas dentro de la vesícula COPI. Además el motivo de di-lisina de la cola citoplasmática de las proteínas p24 sirven como señal de clasificación para reclutar subunidades COPI.

4.2. FUNCIONES

Se han descrito numerosas funciones en las que podrían estar implicadas las proteínas p24, entre ellas:

- Control de calidad en el transporte de proteínas a través de la vía secretora (Wen and Greenwald, 1999; Belden and Barlowe, 2001).
- Selección de cargo y empaquetamiento en vesículas de transporte (Schimmoller et al., 1995; Muniz et al., 2000; Takida et al., 2008; Castillon et al., 2011; Fujita et al., 2011).
- Formación de los sitios de salida del ER (ERES) (Lavoie et al., 1999).
- Formación de vesículas COPI y transporte retrógrado desde el Golgi hasta el ER (Aguilera-Romero et al., 2008).
- Biogénesis y mantenimiento del aparato de Golgi (Mitrovic et al., 2008; Koegler et al., 2010).

Publicaciones recientes proponen que estas proteínas pueden tener un papel importante en procesos fisiológicos de mamíferos tales como:

- El desarrollo embrionario temprano en ratones (Denzel et al., 2000; Jerome-Majewska et al., 2010).
- La biosíntesis de insulina y su subsecuente secreción en células beta del páncreas (Zhang and Volchuk, 2010).
- El metabolismo del precursor beta-amiloide y la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Chen et al., 2006; Vetrivel et al., 2007; Hasegawa et al., 2010).

Por tanto, las proteínas p24 son uno de los grupos más interesantes de proteínas implicados en la regulación de la estructura y función de los orgánulos de la vía secretora.

4.3. RECONOCIMIENTO DE CARGO

A lo largo de los años, se ha propuesto que las proteínas p24 funcionan como receptores de cargo, con la misión de concentrar el cargo dentro de las vesículas COPI o COPII. Sin embargo, el tráfico de cargo putativo mediado por proteínas p24 solo ha podido ser demostrado recientemente en mamíferos y en levadura.

En mamíferos, se ha demostrado que las proteínas p24 forman complejos hetero-oligoméricos que se unen a anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) correctamente remodelados, para concentrar proteínas unidas a GPIs, las GPI-APs (“GPI-anchored proteins”), en los ERES para su correcto empaquetamiento dentro de vesículas COPII y su correcto transporte al complejo de Golgi (Fujita et al., 2011). Una vez en el Golgi, debido a su menor pH, los complejos de p24 se disocian de los GPI-APs, los cuales son transportados a la superficie celular, mientras que las proteínas p24 son recicladas al ER en vesículas COPI.

En levaduras, la salida de GPI-APs parece ser independiente de las proteínas p24. En cambio, los complejos p24 actúan como adaptadores que facilitan la formación de vesículas reclutando los componentes COPII en ERES específicos que ya están enriquecidos en GPI-APs (Castillon et al., 2011).

Se ha demostrado además que las proteínas p24 interactúan con receptores acoplados a proteínas G, incluyendo Receptores PAR (“Protease-Activated Receptor”), PAR-1 y PAR-2, receptores de nucleótidos P2Y y receptores μ -opioides (Luo et al., 2007; Luo et al., 2011).

Sin embargo, las funciones de las proteínas p24 en plantas son esencialmente desconocidas. Las peculiaridades de la vía secretora temprana (ER-Golgi) en células vegetales sugieren la participación de moléculas específicas de plantas en la regulación del tráfico de proteínas y en la organización de los compartimentos de la vía. En este sentido, las proteínas de la familia p24 podrían haber sufrido adaptaciones evolutivas quizás relacionadas con adaptaciones funcionales (ver apartado siguiente).

4.4. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA

Inicialmente la nomenclatura que se utilizaba para estas proteínas en mamíferos y levaduras era poco sistemática, utilizándose nombres únicos, e incluso nombres sin relación con los ortólogos de p24, como por ejemplo: p23, p24, p25, p26 en mamíferos; o Erp1-6p, Emp24p, Erv25p en levaduras. Sin embargo, en años posteriores emergió una nomenclatura más sistemática, primero propuesta por (Dominguez et al., 1998) y recientemente utilizada por (Strating et al., 2009), que divide esta familia de proteínas p24 en 4 subfamilias distintas atendiendo a homología de secuencia: p24alfa, p24beta, p24deta y p24gamma (Figura 13)(Dominguez et al., 1998; Strating et al., 2009).

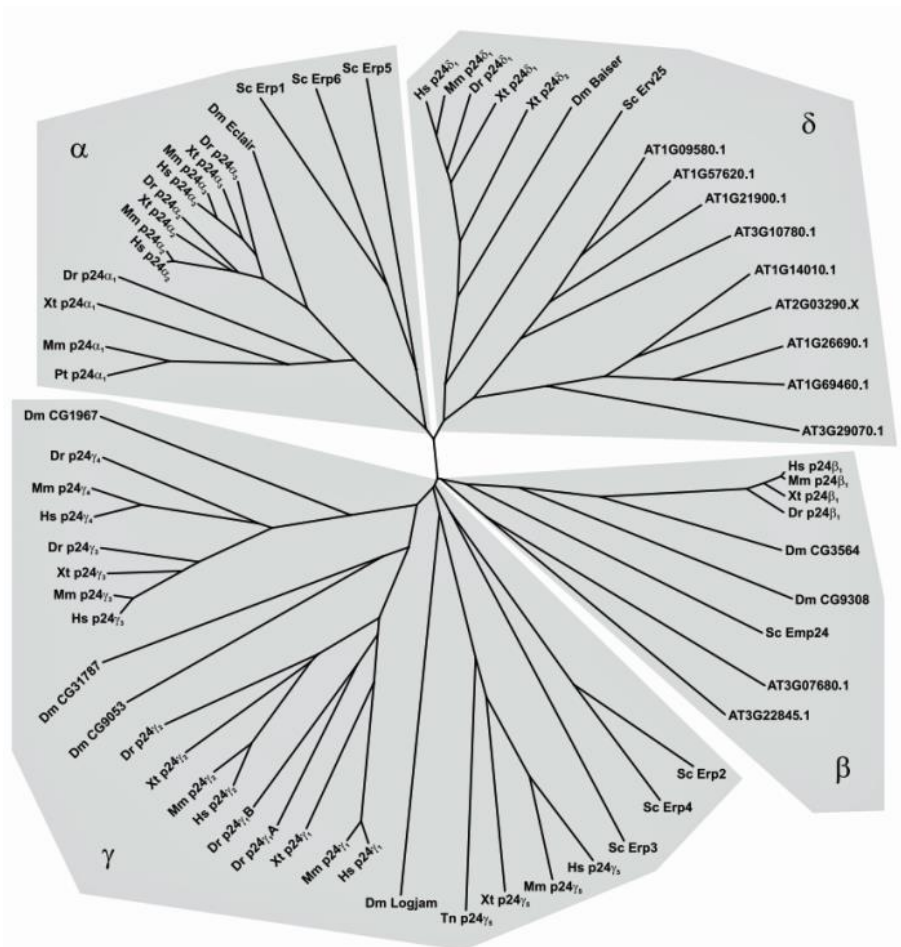


Figura 13. Árbol filogenético de la familia de proteínas p24 (Strating et al., 2009). El árbol filogenético es el resultado de alineamiento de varias secuencias de p24 de distintas especies. Las cuatro subfamilias forman cuatro bloques con sombreado gris. Hs, *Homo sapiens*; Pt, *Pan troglodytes*; Mm, *Mus musculus*; Xt, *Xenopus tropicalis*; Dr, *Danio rerio*; Tn, *Tetraodon nigroviridis*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; y At, *Arabidopsis thaliana*.

En animales y hongos existen representantes de cada una de las cuatro subfamilias. Sin embargo, las plantas sólo poseen representantes de las subfamilias p24beta y p24delta (Figura 13) (Strating et al., 2009). En concreto, en arroz hay 4 miembros de la subfamilia p24delta y 3 de la subfamilia p24beta; en maíz hay 6 miembros de la subfamilia p24delta y 4 miembros p24beta; y en *Populus trichocarpa* (Álamo de California) existen 8 miembros p24delta y 3 p24beta (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>).

En *Arabidopsis* existen 2 miembros de la subfamilia p24beta; que denominamos p24β2 y p24β3 (se había descrito ya una p24β1 no de plantas); y 9 de la subfamilia p24delta, que denominamos p24δ3-11 (ya existían dos miembros no de plantas llamados p24δ1 y p24δ2), los cuales a su vez se pueden dividir en 2 subclases: la subclase p24δ-1 (que incluye p24δ3-6 o p24δ1a-d) y la subclase p24δ-2 (que incluye p24δ7-11 o p24δ1e-i) (Figura 14) (Chen et al., 2012; Montesinos et al., 2012).

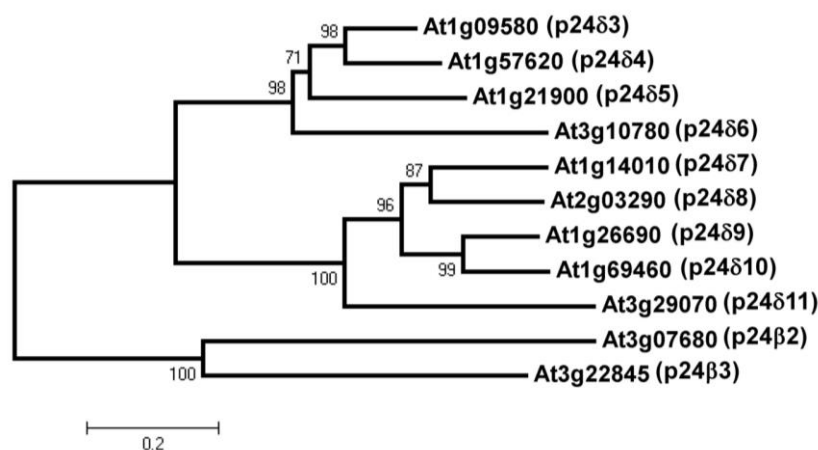


Figura 14. Árbol filogenético que contiene las subfamilias delta y beta de las proteínas p24 de *Arabidopsis*. El alineamiento múltiple de las proteínas p24 fue construido usando el programa ClustalW y el árbol fue generado a partir de ese alineamiento usando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, version 5.03) mediante el método *Neighbor-Joining*. Los números al lado de las ramas representan el porcentaje “bootstrap” basado en 1.000 repeticiones. Los nombres asignados a estas proteínas, siguiendo la nomenclatura propuesta por Domínguez et al. (1998), se muestran junto al código de AGI.

El análisis filogenético de varios miembros de la familia p24 de cuatro especies de vertebrados ha revelado que las subfamilias p24alfa y p24delta tienen un origen en común, del mismo modo que las subfamilias p24beta y p24gamma. En la mayoría de vertebrados, las subfamilias p24alfa y p24gamma se han expandido, mientras que las subfamilias p24beta y p24delta mantienen sólo un miembro de cada subfamilia. De esta manera, de cada par de subfamilias relacionadas evolutivamente (p24alfa/delta y p24beta/gamma), solo una subfamilia se ha expandido. Actualmente aún no está claro si esta observación tiene algún significado fisiológico. Posiblemente, haya un cierto grado de redundancia funcional dentro de las dos ramas, donde la necesidad de expandir ambas subfamilias sea innecesaria. El hecho de que en plantas solo existan miembros de una subfamilia de cada rama (p24beta y p24delta) iría en favor de esta teoría (Carney and Bowen, 2004; Strating and Martens, 2009; Strating et al., 2009).

4.5. LOCALIZACIÓN

Las proteínas de la familia p24 se localizan en los compartimentos de la vía secretora temprana, tales como el ER, el ERGIC, el *cis*-Golgi u otras regiones del aparato del Golgi, así como en vesículas recubiertas por COPI y COPII.

La localización de las proteínas p24 en mamíferos y levaduras depende en gran medida de los motivos presentes en sus colas citoplasmáticas C-terminal. Como hemos visto

anteriormente, la familia de proteínas p24 se dividen en cuatro subfamilias, cada una de las cuales presenta unas características distintas en su extremo C-terminal.

Todas las proteínas p24 de mamíferos tienen un residuo de fenilalanina conservado en su cola citoplasmática, el cual en la mayoría de las ocasiones se localiza en la posición -7 (con respecto al extremo C-terminal), mientras que en la posición -8, en muchos casos se encuentra un residuo hidrofóbico voluminoso, frecuentemente otro residuo de fenilalanina. Se ha demostrado que este par de residuos aromáticos son capaces de unir subunidades COPII, en particular al dímero Sec23/24, y por tanto podría funcionar como una señal de salida del ER hacia el Golgi (Tabla 4) (Dominguez et al., 1998; Contreras et al., 2004b).

Familia proteínas p24 de mamíferos		
Subfamilia p24	Extremo C-terminal	Localización en estado estacionario
p25 (p24 α)	-MRHLKSFF <u>EAKK</u> LV	ER y Golgi
p24 (p24 β)	-IYYLKRFF <u>EVRR</u> VV	Golgi
p23 (p24 δ)	-VFYLRRFF <u>KAKK</u> LIE	ERGIC y <i>cis</i> -Golgi
p26 (p24 γ)	-VLLKSF <u>FTEK</u> RPISRAVHS	<i>cis</i> -Golgi

Tabla 4. Extremo C-terminal y localización de las cuatro subfamilias p24 en mamíferos. Las cuatro subfamilias de proteínas p24 de mamíferos presentan diferentes motivos en sus extremos C-terminales, afectando a su localización en estado estacionario. La subfamilia p24 α es la única que presenta un motivo de di-lisina en posición óptima (-3,-4) para su inclusión en vesículas COPI, siendo la única que se localiza parcialmente en el ER, a diferencia con lo que ocurre con las otras tres subfamilias, cuya localización mayoritaria en estado estacionario es el Golgi y el ERGIC.

Sin embargo, las proteínas p24 pueden presentar otros motivos en su cola C-terminal que pueden determinar su localización en estado estacionario. En el caso de la subfamilia p25 de mamíferos (p24 α 1 – p24 α 3), presenta un motivo de di-lisina en posición (-3, -4) que resulta ser óptimo para su unión a proteínas COPI y, por tanto, para su transporte retrógrado Golgi-ER (Teasdale and Jackson, 1996). De hecho, las proteínas p24 de esta subfamilia p25 (p24 α) son las únicas que localizan parcialmente en el ER, con algo de localización también en el ERGIC. En el caso de la subfamilia p23 (p24 δ 1) de mamíferos, presenta también un motivo de di-lisina, pero en posición (-4,-5), que resulta ser una posición subóptima para la unión de COPI. De esta manera, estas proteínas p23 de mamíferos no se localizan en el ER, sino principalmente en la región *cis*-Golgi (Nickel et al., 1997; Rojo et al., 1997; Blum and Lepier, 2008). En el caso de la subfamilia p24 (p24 β 1), las dos lisinas han sido reemplazadas por dos argininas, que no unen COPI (Contreras et al., 2004a; Cosson and Letourneur, 1994). Como resultado, estas proteínas p24 (p24 β 1) se encuentran mayoritariamente localizadas en el aparato de Golgi (Dominguez et

al., 1998; Blum et al., 1999; Gommel et al., 1999; Emery et al., 2000). Por último, las proteínas p24 de la subclase p26 (p24 γ) de mamíferos tampoco poseen motivo de di-lisina, y se localizan mayoritariamente en el *cis*-Golgi (Tabla 4).

Las 9 proteínas de la subfamilia p24delta de *Arabidopsis* poseen un extremo citosólico C-terminal con las mismas características que las proteínas p24alfa de mamíferos (p24 α 1-3 o p25) (Figura 15): un motivo de di-lisina (KK) en posición -3,-4, que favorece la unión a ARF1 y a subunidades de la cubierta COPI (Contreras et al., 2004a); y un motivo di-aromático en posición (-7,-8), que favorece la unión a subunidades COPII, y que además potencia la unión de COPI al motivo de di-lisina (Contreras et al., 2004a; Contreras et al., 2004b). Estas características facilitan el movimiento bidireccional de estas proteínas p24delta entre los orgánulos de la vía secretora temprana. Sin embargo, unen COPI con mayor afinidad que COPII (Contreras et al., 2004a), lo que permitiría, teóricamente, un reciclaje muy eficaz desde el Golgi hasta el ER en vesículas COPI.

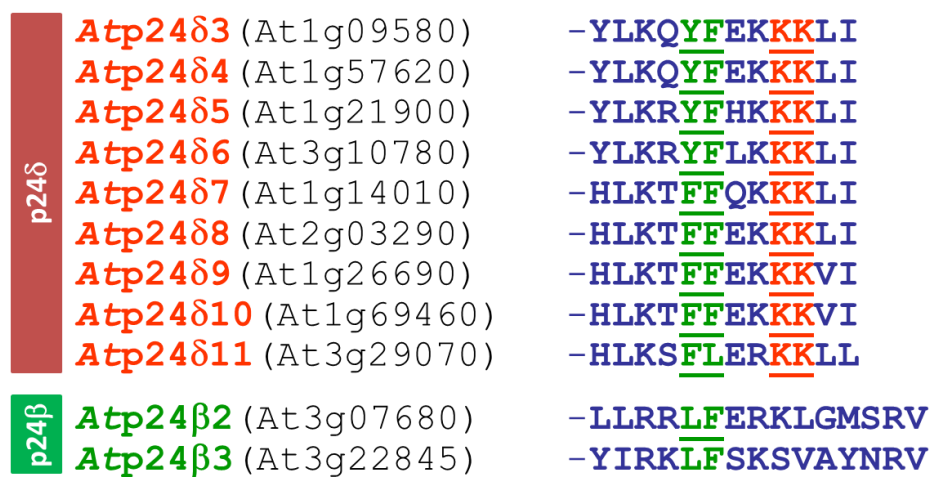


Figura 15. Extremos C-terminales de las proteínas de la familia p24 en *Arabidopsis thaliana*. Secuencias C-terminal de las 9 proteínas p24delta y las 2 proteínas p24beta de *Arabidopsis*. En ellas se puede observar un motivo di-aromático en posición (-7,-8) y un motivo de di-lisina en posición (-3,-4) para las proteínas p24delta; y un motivo di-aromático (-10,-11) en las proteínas p24beta.

Al inicio de la presente tesis, la localización de estas proteínas p24 en *Arabidopsis* aún no había sido determinada. Ensayos previos de expresión transitoria de proteínas en protoplastos, ratificados en la presente tesis, demostraron que la proteína RFP-p24 δ 5 se localiza exclusivamente en el ER en estado estacionario. Además, se demostró que dicha localización era consecuencia del motivo de di-lisina (-3,-4) presente en su cola citoplasmática: mutantes carentes de dicho motivo no se localizaron en el ER sino que eran transportados hacia el PVC y la vacuola (Langhans et al., 2008).

5. RECEPTOR K/HDEL (ERD2)

Los receptores K/HDEL forman parte de una familia de proteínas que poseen 7 dominios transmembrana y que están muy conservadas entre distintas especies. En levaduras y humanos se ha observado que estos receptores orientan su extremo N-terminal hacia el lumen de los orgánulos y su extremo C-terminal hacia el citosol (Munro and Pelham, 1987; Lewis et al., 1990; Semenza et al., 1990; Lewis and Pelham, 1992; Townsley et al., 1993; Wilson et al., 1993).

Este conjunto de receptores fue descubierto en levaduras mediante experimentos de mutagénesis aleatoria con rayos ultravioleta, donde se observó que ciertas cepas eran deficientes en la retención o reciclaje de chaperonas residentes en el ER (Capitani and Sallese, 2009). Por este motivo a estos mutantes se les denominó *erd* (retención en ER defectuosa, “ER-retention defective”). Inicialmente se identificaron en levadura dos genes implicados en esta función: ERD1 y ERD2. En mutantes *erd1* y *erd2* se producía un aumento en la secreción de proteínas que debían ser recicladas desde el Golgi al ER, fundamentalmente chaperonas, pero en el caso de *erd1*, también se producía un déficit en la N-glicosilación de las proteínas que eran secretadas. La sobreexpresión del gen ERD2 en el mutante *erd2* restauraba totalmente la capacidad de reciclar o retener proteínas residentes en el ER, o proteínas que ciclan entre el ER-Golgi (Capitani and Sallese, 2009).

5.1. FUNCIÓN

En levaduras y mamíferos, las proteínas ERD2 son responsables de la retención en el ER de proteínas mediante la recuperación desde el Golgi o el ERGIC de proteínas lumbales del ER que poseen una señal conservada en forma de tetrapéptido en su extremo C-terminal. Esta secuencia es típicamente HDEL en levaduras y KDEL en mamíferos (Munro and Pelham, 1987; Lewis et al., 1990; Semenza et al., 1990; Lewis and Pelham, 1992; Townsley et al., 1993; Wilson et al., 1993). En humanos se han descubierto al menos 3 isoformas de receptores ERD2 (receptores KDEL1-3), expresados de manera similar en todos los tejidos, y que podrían presentar afinidad preferencial por un conjunto específico de secuencias similares a KDEL. De hecho, el receptor KDEL1 une preferentemente proteínas que contienen la señal KDEL sobre la señal HDEL; el receptor KDEL3 tiene muy favorecida su unión a proteínas que presentan el motivo HDEL; y el receptor KDEL2 reconoce preferentemente variantes de HDEL sobre otras (Capitani and Sallese, 2009).

Las proteínas ERD2 reconocen proteínas que han escapado del ER hacia Golgi y permite su transporte de retorno al ER en vesículas COPI. Algunas hipótesis apuntan que la salida del ER de chaperonas y otras proteínas que posteriormente se van a recuperar desde el *cis*-Golgi no es un hecho accidental, sino que es un paso necesario para completar la maduración de estas proteínas, mediante los procesos de glicosilación que se producen en el aparato de Golgi (Capitani and Sallese, 2009).

En el caso del mutante *erd2* de levadura, se produce además una acumulación de membranas intracelulares, sugiriendo que ERD2 podría ser necesario no solo para la recuperación de proteínas residentes en el ER, sino que también podría ser importante a la hora de recuperar componentes que son necesarios para el transporte anterógrado (Semenza et al., 1990; Capitani and Sallese, 2009).

En plantas, las proteínas del lumen de ER pueden contener HDEL o KDEL como señal de retención/recuperación, y dichas señales son necesarias y suficientes para la retención/recuperación desde el *cis*-Golgi de proteínas lumbinales del ER (Denecke et al., 1992; Napier et al., 1992; Hadlington and Denecke, 2000).

La unión del ligando a estos receptores K/HDEL es dependiente del pH, siendo óptima a pH ácido (pH 5.0 – 5.5). Sin embargo, en condiciones de pH neutro o básico, esta unión es muy débil (Wilson et al., 1993; Scheel and Pelham, 1996; Capitani and Sallese, 2009; Dancourt and Barlowe, 2010). Estas observaciones sugieren que las proteínas con secuencias K/HDEL se unen con el receptor K/HDEL en el pH ácido del aparato de Golgi y se liberan en el pH neutro del ER.

En estudios con el receptor K/HDEL de humanos se ha observado que mutaciones en los lazos orientados al citoplasma afectan al transporte que se produce entre ER-Golgi, sin que aparentemente se vea afectada la unión a ligando. Por el contrario, mutaciones en las regiones lumbinales de las dominios transmembrana se traduce en una alteración en la unión de ligando, sin verse afectada su localización, a menos que esta alteración de la localización se esté produciendo por un defecto de unión de ligando (Capitani and Sallese, 2009).

Se han realizado además estudios en ratones, utilizando el mutante D193N del receptor K/HDEL, que se había caracterizado previamente y que mostraba un defecto en el tráfico de estos receptores desde el aparato de Golgi hacia el ER. Las líneas de ratones que expresaban esta versión mutante del receptor mostraron problemas en la respiración, reducción en el

movimiento, y generalmente morían aproximadamente a los 14 meses (Hamada et al., 2004; Capitani and Sallese, 2009).

5.2. LOCALIZACIÓN

En células animales, el receptor KDEL se localiza principalmente en la región *cis* del aparato de Golgi en estado estacionario, pero se redistribuye hacia el ER cuando se sobreexpresan proteínas conteniendo señales KDEL (Lewis and Pelham, 1992). Se cree que esta redistribución se produce gracias a que la unión de ligandos podría estar facilitando la concentración de receptores en regiones específicas, favoreciendo de este modo la captación de componentes de las vesículas COPI y estimulando la inclusión de estos receptores K/HDEL en vesículas COPI para su transporte retrógrado desde el Golgi hacia el ER.

En plantas, las proteínas ERD2 han sido localizadas principalmente en el aparato de Golgi, de manera predominante en la región *cis*-Golgi, con cierto nivel de localización también en ER. La localización en estado estacionario de ERD2 se presume como el resultado de su tráfico bidireccional entre ER y Golgi, el cual implica al transporte anterógrado ER-Golgi mediado por COPII de receptores ERD2 libres, y el transporte retrógrado Golgi-ER mediado por COPI de ERD2 unido a ligandos HDEL/KDEL (Figura 16).

Aunque la interacción entre la proteína ERD2 y subunidades de la cubierta COPII aún no ha sido demostrada, en células de mamífero se ha observado que ERD2 puede colocalizar parcialmente en estructuras punteadas con la proteína Sec13, componente de las vesículas COPII (Majoul et al., 2001).

En relación con el tráfico retrógrado mediado por COPI, se ha demostrado que el receptor KDEL de mamíferos interacciona con la GTPasa de ARF1, "ARF GTPase-activating protein 1" (ARF-GAP1) que se encarga de la hidrólisis del GTP de ARF1 para que se produzca un correcto desensamblaje y fusión de vesículas COPI con la membrana diana; con la subunidad β -COP del coatómero; con proteínas de la familia p24; y con algunas proteínas SNARE (Aoe et al., 1997; Aoe et al., 1998; Majoul et al., 2001; Capitani and Sallese, 2009).

La interacción del receptor KDEL con el coatómero (COPI) implica al motivo KKXSXXX en su cola C-terminal, el cual sólo está activo cuando la serina 209 está fosforilada, ya que tras esa fosforilación el receptor K/HDEL expone un motivo di-lisina necesario para su interacción con

componentes COPI y su subsecuente transporte retrógrado (Cabrera et al., 2003). Esta fosforilación se lleva a cabo por la proteína quinasa A (PKA), aunque aún no se conoce el cuándo y cómo se activa esta PKA (Capitani and Sallese, 2009).

No existen datos del mecanismo del tráfico de ERD2 en plantas. Aunque las proteínas ERD2 de *Arabidopsis* poseen un residuo de serina en su cola C-terminal, ésta está localizada justo por encima de un residuo de lisina, y no hay evidencias de que este residuo se fosfore.

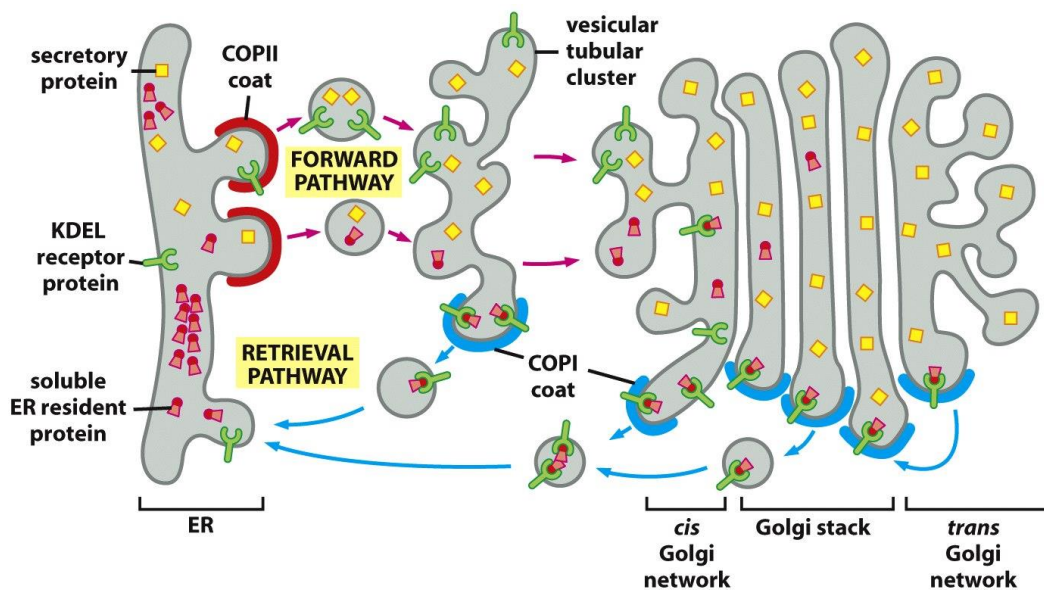


Figura 16. Modelo de tráfico del receptor K/HDEL en la vía secretora temprana (Alberts et al., 2008). El receptor KDEL se localiza en el aparato de Golgi y en el ERGIC (en animales) donde va a unir a proteínas solubles residentes en el ER, facilitando su inclusión en vesículas COPI para su recuperación hacia el ER. Una vez en el ER, el receptor KDEL se separa de las moléculas solubles residentes en el ER, y se incluye en vesículas COPII, para su retorno hacia el ERGIC o Golgi (transporte anterógrado), donde va a ejercer su función. Los receptores KDEL también se encargan de recuperar proteínas solubles residentes en el ER de regiones más distales de Golgi (TGN) hacia regiones más proximales (*cis*-Golgi) mediante vesículas COPI.

En cuanto a su localización subcelular en plantas, se ha observado que las proteínas ERD2 unidas a una etiqueta fluorescente se localizan mayoritariamente en el aparato de Golgi, encontrándose también en menor medida en el ER (Boevink et al., 1998; Brandizzi et al., 2002; Li et al., 2009), o bien localizadas de manera equitativa entre el ER y el aparato de Golgi (Xu et al., 2012).

5.3. CLASIFICACIÓN

El genoma de *Arabidopsis* contiene genes para siete proteínas similares a ERD2, las cuales pueden agruparse en dos clases, dos pertenecientes a la clase I (ERD2a y ERD2b) y otras cinco, más alejadas *filogenéticamente*, que pertenecen a la clase II. El mismo número de proteínas ERD2 parece existir en *Nicotiana tabacum* (Xu et al., 2012).

Se ha observado que las proteínas ERD2a y ERD2b de *N. benthamiana* pueden complementar a mutantes *erd2* de levadura (Lee et al., 1993; Xu et al., 2012). El co-silenciamiento de ERD2a/2b en *N. benthamiana* resulta en un escape de GFP-HDEL/GFP-KDEL y de BiP (una chaperona residente en el ER que contiene la señal HDEL) del ER, sugiriendo que tanto ERD2a como ERD2b actúan como receptores luminales del ER para la recuperación de proteínas que contienen secuencias K/HDEL en plantas (Xu et al., 2012). Se ha propuesto que ERD2b de *Arabidopsis* actúa como un receptor HDEL específico para calreticulina3 (CTR3) (pero no para CRT1, CRT2 o BiP) permitiendo su transporte retrógrado desde el complejo de Golgi hasta el ER (Li et al., 2009).

En plantas, se ha observado que ERD2a/ER2b de *N. benthamiana* pueden formar homo o heterodímeros, e interactúan con el factor de ribosilación ADP (ARF1) y sus potenciales proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), sugiriendo que la oligomerización de ERD2 puede contribuir a su salida dentro de vesículas COPI en plantas (Xu and Liu, 2012).

OBJETIVOS

Las proteínas de la familia p24 son posibles receptores de carga soluble en el transporte en la vía biosintética/secretora, pero sus funciones en plantas son esencialmente desconocidas. Las peculiaridades de la vía secretora temprana (ER-Golgi) en células vegetales sugieren la participación de moléculas específicas de plantas en la regulación del tráfico de proteínas y en la organización de los compartimentos de la vía. El principal objetivo de la presente Tesis doctoral ha sido la caracterización estructural y funcional de proteínas de la familia p24 de *Arabidopsis thaliana*, para investigar si las características de esta familia p24 en plantas se corresponden con funciones específicas, tales como la organización de la vía secretora temprana o el transporte de moléculas específicas (cargos) entre los distintos orgánulos de la ruta.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar la localización y el tráfico intracelular de proteínas de la familia p24 en la vía secretora temprana, establecer los determinantes estructurales que intervienen en dicho tráfico y analizar posibles interacciones entre distintas proteínas de esta familia.
2. Investigar posibles funciones de las proteínas p24, incluyendo la identificación de posibles ligandos, mediante experimentos de pérdida de función, utilizando mutantes de expresión nula o disminuida de proteínas de la familia p24, así como experimentos de ganancia de función sobreexpresando proteínas p24 específicas.

RESULTADOS

RESUMEN DE LOS ARTÍCULOS

ARTÍCULO 1: “Coupled transport of *Arabidopsis* p24 proteins at the ER–Golgi interface” (Montesinos et al., 2012)

El objetivo de este trabajo fue el establecimiento de la localización de miembros de las dos subfamilias de proteínas p24 de *Arabidopsis thaliana*, y el estudio de los dominios responsables de dicha localización, por estar implicados en interacciones entre distintos miembros, que determinan su tráfico y localización.

En este primer trabajo, nos centramos en el estudio de un miembro de cada una de las dos subfamilias, seleccionando para ello proteínas que se expresaran ampliamente y de manera elevada en todos los tejidos, en concreto p24 δ 5 como representante de la subfamilia p24 δ , y p24 β 2 como representante de la subfamilia p24 β . Para ello, se generaron anticuerpos específicos contra los extremos N- y C-terminal de estas proteínas, que se utilizaron en ensayos de inmunolocalización para determinar la localización de las proteínas endógenas. Estos experimentos mostraron que p24 δ 5 se localiza mayoritariamente en el ER, pero también parcialmente en la cara *cis* del complejo de Golgi, mientras que p24 β 2 se localiza mayoritariamente en el complejo de Golgi, con una localización parcial en el ER. Además, se caracterizaron mutantes de expresión nula para dos miembros de la subfamilia p24 δ : *p24 δ 4-1* y *p24 δ 5-1*. Dichos mutantes se utilizaron para verificar la especificidad de los anticuerpos así como para localizar otro miembro de la familia p24, p24 δ 4, cuya localización fue muy similar a la de p24 δ 5. En ambos mutantes, las plantas crecidas en condiciones de crecimiento estándar no mostraron alteraciones fenotípicas.

Para determinar el tráfico y localización de estas proteínas, y para poder determinar los dominios responsables de dicha localización, se utilizaron ensayos de expresión transitoria de proteínas p24 de *Arabidopsis* unidas a una proteína fluorescente, en protoplastos de tabaco y de *Arabidopsis thaliana*. En el caso de RFP-p24 δ 5 se utilizaron además versiones mutantes careciendo del dominio GOLD, el dominio “coiled-coil” (CC) o ambos. Estos ensayos demostraron que RFP-p24 δ 5 se localiza exclusivamente en el ER. Mutantes carentes del dominio GOLD o el dominio CC también se localizaron exclusivamente en el ER, sugiriendo que la localización de RFP-p24 δ 5 en el ER en estado estacionario, al menos cuando se expresa de forma individual, no requiere de sus dominios luminales. Además, un mutante careciendo de ambos dominios (que contenía el dominio transmembrana y la cola citosólica C-terminal) se localizó también de forma exclusiva en el ER, lo que sugiere que la cola citosólica de p24 δ 5,

que contiene un motivo de di-lisina, es suficiente para la localización de p24 δ 5 en el ER. Experimentos previos habían mostrado que la inhibición del reciclaje desde el aparato de Golgi hasta el ER, mediante la co-expresión del mutante ARF1 (Q71L), que interfiere en la formación de vesículas COPI, provocaba una relocalización de p24 δ 5 desde el ER hasta el complejo de Golgi, lo que sugiere que p24 δ 5, aunque se localiza en el ER, cicla entre ER y Golgi. El mismo comportamiento se obtuvo al analizar el tráfico de los mutantes de delección careciendo del dominio GOLD, CC o ambos, sugiriendo que ambos dominios tampoco son necesarios para el transporte de p24 δ 5 entre el ER y el complejo de Golgi y, en general, para el tráfico de p24 δ 5 en la vía secretora temprana.

A continuación se analizó el tráfico de mutantes de delección que carecían del motivo de di-lisina en su cola citosólica. Resultados previos de nuestro grupo habían demostrado que dichos mutantes no podían ser reciclados hacia el ER y eran transportados, posiblemente por defecto, hasta el compartimento prevacuolar (PVC) y la vacuola. Estos experimentos pusieron de manifiesto que la parte luminal de p24 δ 5, en particular el dominio CC, podría estar implicada en el transporte de p24 δ 5 hasta la vacuola. Estos resultados se corroboraron mediante aproximaciones bioquímicas. Mientras que los niveles del mutante de di-lisina conteniendo su dominio luminal intacto eran muy bajos comparados con los de la proteína salvaje, los niveles del mutante de di-lisina sin el dominio CC eran claramente mayores, lo que sugería que su menor transporte a vacuola podría correlacionarse con una menor degradación.

También se analizó el tráfico y la localización de GFP-p24 β 2, que mostró una localización en estructuras punteadas, donde co-localizó extensivamente con el marcador de Golgi Manosidasa-GFP (ManI-GFP), sugiriendo que p24 β 2 se localiza mayoritariamente en el complejo de Golgi en estado estacionario. Sin embargo, se demostró que esta proteína también es capaz de ciclar entre ER-Golgi, puesto que cuando se co-expresó con el mutante ARF1 (Q71L), que inhibía el transporte retrógrado desde el Golgi hasta el ER, la proteína GFP-p24 β 2 se transportó hacia la vacuola. También se observó una baja estabilidad de esta proteína cuando se expresaba individualmente. Esta estabilidad aumentaba cuando se co-expresaba con el otro miembro de la familia p24, la proteína p24 δ 5, pero no con un mutante de delección careciendo del dominio CC, sugiriendo que la interacción con p24 δ 5, a través del dominio CC, aumenta la estabilidad de p24 β 2.

Para la determinación de posibles interacciones homo o heterotípicas entre proteínas p24, se utilizaron ensayos de expresión transitoria de proteínas p24 en protoplastos de tabaco o de *Arabidopsis thaliana* y aproximaciones bioquímicas, bien mediante ensayos de co-

inmunoprecipitación o mediante la utilización de mutantes, para observar si la ausencia de una de estas proteínas p24 podía repercutir en la estabilidad de otras proteínas p24.

En ensayos de expresión transitoria, se observó que la co-expresión con RFP-p24 δ 5 produjo un aumento muy significativo en los niveles de GFP-p24 β 2, que no se producía cuando se utilizaba un mutante de delección de RFP-p24 δ 5 careciendo del dominio CC, nuevamente sugiriendo que ambas proteínas interactúan a través de los dominios CC. Además, la co-expresión con GFP-p24 β 2 cambió el patrón de localización de RFP-p24 δ 5, que además de localizarse en el ER, mostró una localización en puntos donde co-localizó extensivamente con GFP-p24 β 2. Esta co-localización entre p24 δ 5 y p24 β 2 se produjo, al menos de manera parcial, en regiones especializadas del ER, conocidas como ERES, ya que co-localizaron con un marcador putativo de ERES/COPII (6 kDa-VP).

En experimentos donde se expresó el mutante ARF1 (Q71L) para inhibir el transporte retrógrado (Golgi-ER), se observó que cuando se co-expresaba con RFP-p24 δ 5, GFP-p24 β 2 ya no era transportada hacia vacuola, como ocurría cuando se expresaba individualmente, sino que mantenía una localización punteada (posiblemente Golgi), donde co-localizaba extensivamente con la proteína RFP-p24 δ 5, sugiriendo que p24 δ 5 es capaz de mantener a p24 β 2 en la interfase ER-Golgi, lo que podría contribuir a su mayor estabilidad.

Cuando se analizaron los niveles de p24 β 2 en un mutante nulo de p24 δ 5 se observó que estos disminuyeron de forma muy significativa, sugiriendo de nuevo que la estabilidad de p24 β 2 depende de su interacción con p24 δ 5. Finalmente, ensayos de co-inmunoprecipitación demostraron la interacción directa entre ambas proteínas.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que p24 δ 5 y p24 β 2 son co-transportadas en la interfase ER-Golgi: p24 δ 5 y p24 β 2 salen de manera conjunta del ER, concentrándose en regiones concretas conocidas como ERES, para viajar mediante vesículas COPII hasta el complejo de Golgi. La proteína p24 δ 5 puede volver de manera eficiente desde el *cis*-Golgi hasta el ER mediante vesículas COPI, gracias al motivo de di-lisina presente en su extremo C-terminal.

ARTÍCULO 2: “Putative p24 complexes in *Arabidopsis* contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway” (Montesinos et al., 2013)

En este segundo trabajo se amplió el estudio a otros miembros de la familia de proteínas p24 de *Arabidopsis*. Por una parte, la proteína p24 δ 9, otro miembro de la subfamilia p24 δ que, a diferencia de p24 δ 5 (subclase p24 δ -1), pertenece a la subclase p24 δ -2. También se estudió el otro miembro de la subfamilia p24 β , la proteína p24 β 3. Además se comenzó con el estudio funcional de las mismas.

Para este estudio se generaron anticuerpos específicos frente al extremo N-terminal de las proteínas p24 δ 9 y p24 β 3, que se utilizaron en ensayos de inmunolocalización para determinar la localización de las proteínas endógenas. Estos experimentos mostraron que la proteína p24 δ 9 se localiza mayoritariamente en el ER, pero también parcialmente en la cara *cis* del aparato de Golgi, siguiendo el mismo patrón de localización que mostraba la proteína p24 δ 5. Por su parte, p24 β 3 se localizó mayoritariamente en el aparato de Golgi, con una localización parcial en el ER, como ya sucedía con el otro miembro de la subfamilia p24 β , p24 β 2.

También se caracterizaron mutantes de expresión nula para la proteína p24 δ 10 (p24 δ 10-1) que pertenece a la subclase p24 δ -2, y mutantes amiRNA de expresión reducida (actualmente no existen mutantes de expresión nula) para las proteínas p24 β 2 (amiR-p24 β 2) y p24 β 3 (amiR-p24 β 3). Los mutantes de expresión reducida mostraron una disminución de la expresión génica en torno al 70-80%. Estos mutantes se utilizaron para evaluar posibles interacciones entre las distintas proteínas p24, analizando los niveles de expresión del resto de proteínas p24. Ninguno de los mutantes mostró alteraciones fenotípicas cuando se cultivaron en condiciones de crecimiento estándar.

Para determinar el tráfico y localización de estas proteínas, se utilizaron ensayos de expresión transitoria de las proteínas p24 δ 9 y p24 β 3 de *Arabidopsis* unidas a una proteína fluorescente, RFP-p24 δ 9 y GFP-p24 β 3, en protoplastos de tabaco y en células de la epidermis de hojas de *N. tabacum*. Estos ensayos demostraron que RFP-p24 δ 9 se localizaba exclusivamente en el ER, de manera muy similar a lo que ocurría con RFP-p24 δ 5. En el caso de GFP-p24 β 3, se localizó en estructuras punteadas que co-localizaron con marcadores del aparato de Golgi. Esta localización fue muy similar a la observada para GFP-p24 β 2 en el primer trabajo. El transporte anterógrado ER-Golgi de ambas proteínas, p24 β 2 y p24 β 3, fue

dependiente de las vesículas recubiertas por COPII, puesto que tras la sobreexpresión de Sec12, que inhibe la formación de vesículas COPII, ambas proteínas se localizaron en el ER. En el caso particular de p24 β 3, además de un patrón de localización reticular, se observó un patrón de localización punteado, que podría corresponder con los ERES, puesto que co-localizaba con un marcador de dichas estructuras (6 kDa-VP). Este resultó ser un comportamiento diferencial entre ambas proteínas p24 β .

Como en el caso de GFP-p24 β 2, GFP-p24 β 3 también mostró una baja estabilidad cuando se expresaba individualmente. Por esta razón, ambas proteínas se expresaron en presencia de distintos inhibidores de proteasas para establecer su mecanismo de degradación. Se observó que los niveles de expresión de ambas proteínas aumentaban en presencia del inhibidor de cisteín proteasas E-64, pero no con el inhibidor del proteasoma MG-132. Esto sugiere que ambas proteínas se degradan por cisteín proteasas, posiblemente como consecuencia de su transporte a compartimentos ácidos tales como el PVC o la vacuola, y no por el proteasoma.

Para la determinación de las posibles interacciones entre las distintas proteínas p24, se utilizaron las mismas aproximaciones utilizadas en el artículo previo, ensayos de expresión transitoria de proteínas p24 fluorescentes en protoplastos de tabaco y en células de epidermis de *N. tabacum*, y aproximaciones bioquímicas, bien mediante experimentos de co-inmunoprecipitación y “pull-downs” para detectar interacciones directas entre proteínas p24, o analizando los niveles de distintas proteínas p24 en los diferentes mutantes.

Se observó que la proteína GFP-p24 β 2 co-localizó extensivamente con la proteína RFP-p24 δ 9, como ocurría con RFP-p24 δ 5, que la presencia de RFP-p24 δ 9 aumentaba los niveles de GFP-p24 β 2, y la presencia de GFP-p24 β 2 modificaba parcialmente la distribución de RFP-p24 δ 9 hacia un patrón de expresión más punteado, donde se produce la co-localización entre ambas proteínas. Esta co-localización se produce, al menos parcialmente, en los ERES, donde ambas proteínas co-localizan con el marcador de ERES (6 kDa-VP), y en el complejo de Golgi. Por el contrario, la proteína GFP-p24 β 3, expresada en protoplastos, presentó una co-localización muy baja con RFP-p24 δ 5 y con RFP-p24 δ 9. El patrón de expresión de p24 β 3 fue punteado y con unos niveles muy bajos, como ocurría cuando se expresaba esta proteína en solitario. El patrón de localización de las proteínas RFP-p24 δ 5 y RFP-p24 δ 9 no se vio afectado por la presencia de GFP-p24 β 3, a diferencia de lo que sucedía con GFP-p24 β 2. Además observamos que cuando se expresaron RFP-p24 δ 5, RFP-p24 δ 9, GFP-p24 β 2 y GFP-p24 β 3 simultáneamente, se producía una co-localización parcial entre las cuatro proteínas, donde GFP-p24 β 2 mostró una señal más punteada y GFP-p24 β 3 presentó una señal más reticular. Cuando se expresaron

las proteínas GFP-p24 β 2 y GFP-p24 β 3 con alguna de las dos proteínas p24 δ (RFP-p24 δ 5 o RFP-p24 δ 9) se observó una co-localización parcial entre las tres proteínas, donde GFP-p24 β 3, que parecía no interactuar con RFP-p24 δ 5 o RFP-p24 δ 9, podría unirse al dímero RFP-p24 δ 5/GFP-p24 β 2 o RFP-p24 δ 9/GFP-p24 β 2 para formar un trímero. El conjunto de estos resultados sugieren que las proteínas p24 podrían formar diferentes complejos heteroméricos (dímeros, trímeros e incluso tetrameros) para su tráfico acoplado en la interfase ER-Golgi.

Cuando se realizaron ensayos de estabilidad utilizando los mutantes simples p24 generados en estos dos primeros trabajos se observó que en las proteínas de la familia p24 de *Arabidopsis*, la pérdida de un miembro de la subclase p24 δ -1 (*p24 δ 5-1* o *p24 δ 4-1*) causa una reducción en los niveles de miembros de la subclase p24 δ -2 (p24 δ 9), pero no del resto de miembros de la subclase p24 δ -1. Estos mutantes de la subclase p24 δ -1 mostraron además niveles de proteína reducidos para p24 β 2 y p24 β 3. Por otro lado, mutantes de la subclase p24 δ -2 (*p24 δ 10-1*), mostraron niveles aumentados de otros miembros de la misma subclase (como es p24 δ 9), probablemente como un mecanismo compensatorio de la ausencia de una proteína de la misma subclase, lo que justificaría que posean niveles normales de los miembros de la subclase p24 δ -1, y de las proteínas p24 β 2 y p24 β 3. Finalmente, las líneas de expresión reducida amiRNA para p24 β 2 o p24 β 3 mostraron niveles proteicos reducidos para p24 β 3 y p24 β 2 (respectivamente) y para las proteínas p24 δ de ambas subclases. Esto confirma que la ausencia de una determinada proteína p24 puede modificar la estabilidad de otras proteínas p24, como consecuencia de la dependencia que existe entre ellas para una correcta localización y estabilidad.

En los ensayos de inmunoprecipitación de proteínas endógenas, utilizando los anticuerpos específicos generados en el primer y en este segundo trabajo, se observó que la proteína p24 δ 5 interactúa con las proteínas p24 β 2, p24 β 3 y p24 δ 9; y que la proteína p24 β 2 también interactuó con las proteínas p24 δ 5, p24 δ 9 y p24 β 3. Cuando los experimentos de inmunoprecipitación se realizaron con proteínas expresadas transitoriamente en protoplastos, se observó de nuevo que la proteína p24 δ 5 es capaz de interactuar con p24 β 2 y p24 β 3, y que la proteína p24 δ 9 también interactuaba con p24 β 2 y p24 β 3. Esto sugiere que se podrían estar formando complejos hetero-oligoméricos que contienen miembros de la subfamilia p24 β y p24 δ .

En este trabajo se iniciaron estudios funcionales de las proteínas p24 de *Arabidopsis*, estudiando la relación de estas proteínas con un candidato a proteína cargo, como es el receptor K/HDEL (ERD2). Para ello nos basamos en ensayos de expresión transitoria en protoplastos de tabaco, donde se observó el posible efecto de la sobreexpresión de p24 δ 5 sobre la localización del receptor ERD2 en estado estacionario. Para este fin utilizamos las proteína p24 δ 5 y el receptor ERD2 unidas a una proteína fluorescente (RFP-p24 δ 5 y ERD2-YFP). La sobreexpresión de RFP-p24 δ 5 modificó el patrón de localización del receptor ERD2-YFP, desde el Golgi (donde se localizaba mayoritariamente en estado estacionario), hacia un patrón de localización mixto ER y Golgi. Este efecto fue dependiente del motivo de di-lisina en el extremo C-terminal de p24 δ 5, ya que una versión mutante careciendo de dicho motivo careció de efecto sobre la localización de ERD2a-YFP. Estos resultados sugieren una participación directa de la proteína p24 δ 5 en el transporte retrógrado del receptor ERD2, fundamental para que éste pueda realizar su función específica como receptor de proteínas residentes en ER con señal HDEL/KDEL que hayan podido escapar del ER.

ARTÍCULO 3: “*Arabidopsis* p24 δ 5 and p24 δ 9 facilitate COPI-dependent Golgi-to-ER transport of the K/HDEL receptor ERD2” (Montesinos et al., 2014)

En este trabajo se ha continuado con el estudio funcional de las proteínas p24, en particular centrado en la posible participación de p24 δ 5 en el transporte del receptor de K/HDEL (ERD2) desde el Golgi hasta el ER. En este tercer trabajo se ha investigado la posible interacción entre p24 δ 5 y ERD2, determinando los dominios importantes de p24 δ 5 para dicha interacción y su pH óptimo, el efecto que provoca la sobreexpresión de un ligando del receptor sobre la distribución de los receptores K/HDEL (ERD2a y ERD2b), la interacción de p24 δ 5/p24 δ 9 y ERD2a con proteínas de la cubierta COPI y COPII y finalmente como se ve afectada la secreción al exterior celular de ligandos de ERD2, cuando aumenta la función de proteínas p24 y/o ERD2.

En este trabajo se utilizaron ensayos de expresión transitoria, tanto en protoplastos de tabaco como en hojas de tabaco transformadas mediante agroinfiltración, para determinar la localización de versiones funcionales de ERD2a y ERD2b o p24 δ 5/ δ 9. También se utilizó un ligando del receptor ERD2, la proteína Cherry-HDEL, para evaluar si la sobreexpresión de este ligando puede afectar también a la distribución en estado estacionario del receptor K/HDEL.

Se observó que la expresión transitoria de ligandos HDEL produjo una redistribución de los receptores ERD2a y ERD2b de *Arabidopsis* desde el Golgi hasta el ER, sugiriendo que la expresión de ligandos HDEL podría favorecer la oligomerización de receptores ERD2 y de este modo favorecerse su inclusión en vesículas recubiertas por COPI. En este mismo sentido, se observó el mismo efecto de redistribución de los receptores ERD2 cuando se expresaron transitoriamente proteínas p24 δ de las subclases p24 δ -1 (p24 δ 5) y p24 δ -2 (p24 δ 9), sugiriendo que la sobreexpresión de proteínas p24 δ puede mejorar la inclusión de estos receptores ERD2 con su ligando ya unido en vesículas COPI para su transporte retrógrado desde Golgi hasta el ER. El dominio GOLD de la proteína p24 δ 5 resultó ser esencial para este efecto sobre ERD2a-YFP, puesto que las versiones de RFP-p24 δ 5 sin el dominio GOLD, carecieron de efecto sobre la localización del receptor ERD2a-YFP en estado estacionario.

Para evaluar el posible efecto tanto de ERD2 como de p24 δ 5 (o de ambas en conjunto) sobre la eficacia de retención de proteínas que residen en el ER que no deben ser secretadas, se utilizó una versión de GFP con una señal de HDEL en su extremo C-terminal (GFP-HDEL), que

permite su recuperación hacia el ER. En estos ensayos se observó que la sobreexpresión de GFP-HDEL produce la secreción de un porcentaje de este ligando, posiblemente por la saturación de la maquinaria de recuperación. Cuando se sobreexpresó además el receptor ERD2a-YFP, se produjo una disminución en la secreción de GFP-HDEL, indicando que ERD2a-YFP es funcional en la recuperación de ligandos HDEL. Resultados muy similares se obtuvieron al sobreexpresar la proteína RFP-p24 δ 5, indicando que p24 δ 5 puede facilitar la recuperación de ligandos HDEL. El efecto fue mayor y por tanto la secreción se vio disminuida de manera más eficiente, cuando ERD2a-YFP y RFP-p24 δ 5 se expresaron simultáneamente, generando un efecto aditivo. En este tipo de experimentos se puso de manifiesto además la esencialidad del dominio GOLD de la proteína p24 δ 5, puesto que tras la expresión de la versión de RFP-p24 δ 5 sin el motivo GOLD, no se produjo ningún efecto en la secreción de GFP-HDEL. En el mismo tipo de ensayos estudiamos la secreción de una proteína endógena con señal HDEL en su secuencia, la chaperona BiP. En este caso, la proteína BiP aumentaba sus niveles de secreción cuando se sobreexpresaba la proteína GFP-HDEL, debido a la saturación de la maquinaria de recuperación. El efecto sobre la secreción de BiP fue muy similar al que se obtuvo en los experimentos de secreción de GFP-HDEL: la sobreexpresión de ERD2a-YFP y/o RFP-p24 δ 5 produjo una disminución en la secreción de BiP, resultando ser más eficiente cuando ambas proteínas se expresaban simultáneamente.

El efecto de RFP-p24 δ 5 y ERD2a-YFP resultó ser específico para la secreción de ligandos K/HDEL (GFP-HDEL o BiP) puesto que la secreción de otra proteína control, que no posee señales KDEL/HDEL en su secuencia, como es Sec-GFP, no se vio alterada en presencia de estas dos proteínas.

Se utilizaron además ensayos de “pull-down” e inmunoprecipitación para determinar posibles interacciones entre estas proteínas. En los ensayos “pull-down”, se utilizaron anticuerpos frente a las etiquetas fluorescentes (RFP/YFP) de RFP-p24 δ 5 (y sus versiones deletadas), RFP-p24 δ 9, ERD2a-YFP y GFP-p24 β 2. En estos experimentos se observó que ERD2a-YFP y RFP-p24 δ 5/ δ 9 interactúan, y que esta interacción es dependiente de pH, siendo mucho más eficiente a pH ácido (6.0) que a pH neutro (7.5). Además el dominio GOLD de la proteína p24 δ 5 es necesario para que se produzca dicha interacción. Estos resultados sugieren que RFP-p24 δ 5 y ERD2a-YFP interactúan más favorablemente a un pH más ácido como el del *cis*-Golgi y que esta interacción es dependiente del dominio GOLD de la proteína p24 δ 5, aunque queda por esclarecer si esta interacción es una interacción directa a través de este dominio, o si es una interacción indirecta donde el dominio GOLD resulta ser fundamental.

Utilizando esta misma clase de experimentos y anticuerpos específicos frente a subunidades de las cubiertas COPI y COPII, se observó que tanto ERD2a-YFP como RFP-p24 δ 5 son capaces de interactuar con ARF1 y α/γ -COP (subunidades COPI) de manera más eficiente a pH ácido (6.0), mientras que interactúan con Sec23 (subunidad COPII) de manera más eficiente a pH neutro (7.5). No se observó un aumento en la interacción de estas proteínas con las subunidades de COPI y COPII cuando se expresaron de manera simultánea. Estos resultados sugieren que la interacción entre las proteínas RFP-p24 δ 5 y ERD2a-YFP y las subunidades del complejo COPII (transporte anterógrado ER-Golgi) está favorecida al pH neutro del ER, mientras que la unión con el complejo COPI está favorecida al pH más ácido del aparato de Golgi, lugar desde el cual se produce el transporte retrógrado Golgi-ER. La variación de pH en el lumen de los distintos orgánulos podría estar provocando un cambio conformacional en dichas proteínas, favoreciendo su unión a un tipo de cubierta o a otra.

También se han realizado ensayos de co-inmunoprecipitación con proteínas endógenas utilizando anticuerpos específicos generados en el primer trabajo frente a p24 δ 5 y p24 β 2. Se observó que p24 δ 5 interactúa con la proteína ERD2b solo a pH ácido (6.0) (pero no a pH neutro), mientras que por el contrario la proteína p24 β 2 no interactúa con ERD2b en ninguna de las dos condiciones de pH. Estos mismos experimentos sirvieron para ver que la interacción ya documentada entre p24 δ 5 y p24 β 2 es más eficiente a pH neutro (7.5) que a pH ácido (6.0), sugiriendo que la unión entre ambas proteínas se produce más favorablemente en el entorno del ER, donde nuestro modelo había previsto que se producía tal interacción para que se produjese un transporte acoplado entre ambas proteínas desde el ER hacia el aparato de Golgi.

ARTÍCULOS

ARTÍCULO 1

Coupled transport of *Arabidopsis* p24 proteins at the ER–Golgi interface

Juan Carlos Montesinos, Silke Sturm, Markus Langhans, Stefan Hillmer,
María Jesús Marcote, David G. Robinson and Fernando Aniento

Journal of Experimental Botany, Vol. 63, No. 11, pp. 4243–4261, 2012

doi:10.1093/jxb/ers112

RESEARCH PAPER

Coupled transport of *Arabidopsis* p24 proteins at the ER–Golgi interface

Juan Carlos Montesinos^{1,*}, Silke Sturm^{2,*}, Markus Langhans², Stefan Hillmer², María Jesús Marcote¹, David G. Robinson² and Fernando Aniento^{1,†}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Spain

² Department of Plant Cell Biology, Centre for Organismal Studies, University of Heidelberg, Germany

* These authors contributed equally to this work

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: Fernando.aniento@uv.es

Received 23 December 2011; Revised 19 March 2012; Accepted 20 March 2012

Abstract

p24 proteins are a family of type I membrane proteins localized to compartments of the early secretory pathway and to coat protein I (COPI)- and COPII-coated vesicles. They can be classified, by sequence homology, into four subfamilies, named p24 α , p24 β , p24 γ , and p24 δ . In contrast to animals and fungi, plants contain only members of the p24 β and p24 δ subfamilies. It has previously been shown that transiently expressed red fluorescent protein (RFP)–p24 δ 5 localizes to the endoplasmic reticulum (ER) as a consequence of highly efficient COPI-based recycling from the Golgi apparatus. Using specific antibodies, endogenous p24 δ 5 has now been localized to the ER and p24 β 2 to the Golgi apparatus in *Arabidopsis* root tip cells by immunogold electron microscopy. The relative contributions of the cytosolic tail and the luminal domains to p24 δ 5 trafficking have also been characterized. It is demonstrated that whereas the dilysine motif in the cytoplasmic tail determines the location of p24 δ 5 in the early secretory pathway, the luminal domain may contribute to its distribution downstream of the Golgi apparatus. By using knock-out mutants and co-immunoprecipitation experiments, it is shown that p24 δ 5 and p24 β 2 interact with each other. Finally, it is shown that p24 δ 5 and p24 β 2 exhibit coupled trafficking at the ER–Golgi interface. It is proposed that p24 δ 5 and p24 β 2 interact with each other at ER export sites for ER exit and coupled transport to the Golgi apparatus. Once in the Golgi, p24 δ 5 interacts very efficiently with the COPI machinery for retrograde transport back to the ER.

Key words: *Arabidopsis*, coat protein (COP) I, coat protein (COP) II, ER–Golgi transport, p24 proteins, secretory pathway.

Introduction

p24 proteins constitute a family of small (20–25 kDa) type I membrane proteins which in mammals and yeast localize to the endoplasmic reticulum (ER), the ER–Golgi intermediate compartment (ERGIC), the *cis*-Golgi network (CGN), or the Golgi apparatus (Stamnes *et al.*, 1995; Belden and Barlowe, 1996; Blum *et al.*, 1996, 1999; Sohn *et al.*, 1996; Nickel *et al.*, 1997; Rojo *et al.*, 1997; Dominguez *et al.*, 1998; Füllkrug *et al.*, 1999; Gommel *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 2000). They are also major constituents of both coat protein I (COPI)- (Stamnes *et al.*, 1995; Sohn *et al.*, 1996; Gommel *et al.*, 1999) and COPII- (Schimmöller *et al.*, 1995; Belden and Barlowe, 1996) coated vesicles. All p24 proteins share the same topology: an

N-terminal signal sequence, a large luminal portion, which includes the GOLD (GOLgi Dynamics) and coiled-coil domains, a single transmembrane domain, and a short (12–18 amino acids) cytoplasmic C-terminus (for a review, see Strating and Martens, 2009). The coiled-coil domain of p24 proteins enables intermolecular interactions between copies of the same protein, but also between different p24 proteins (Fullerkrug *et al.*, 1999; Gommel *et al.*, 1999; Marzioch *et al.*, 1999; Jenne *et al.*, 2002). Indeed it has been proposed that oligomerization is required for the proper localization of p24 proteins (Emery *et al.*, 2000; Ciufo and Boyd, 2000). The luminal GOLD domain, present in several proteins involved in Golgi dynamics, is predicted to be involved in

specific protein–protein interactions and has been postulated to interact with putative cargo proteins (Anantharaman and Aravind, 2002; Carney and Bowen, 2004).

In the past it has been customary in mammalian and yeast p24 research to use individual, sometimes unrelated names for p24 orthologues (e.g. p23, p24, p25, p26, in mammals; Erp1-6p; Emp24p, Erv25p in yeast). However, a more systematic nomenclature has now emerged, first proposed by Dominguez *et al.* (1998) and recently updated in Strating *et al.* (2009), which places p24 proteins into one of four subfamilies named p24 α , p24 β , p24 γ , and p24 δ . Whereas animals and fungi have representatives in all four subfamilies, plants have only members of the p24 δ (nine in *Arabidopsis*) and the p24 β (two in *Arabidopsis*) subfamilies (Carney and Bowen, 2004). Following this nomenclature, *Arabidopsis* p24 proteins have been named here with a Greek letter (to identify the subfamily) followed by a number (Fig. 1A). In the case of the delta subfamily, two non-plant members had already been called p24 δ 1 and 2 (Strating *et al.*, 2009). Therefore, the nine *Arabidopsis* members were named p24 δ 3–p24 δ 11 (in the order they appear in the phylogenetic tree) (Fig. 1A). In the case of the beta subfamily, there was already a p24 β 1 (Strating *et al.*, 2009), and thus the two *Arabidopsis* members were named p24 β 2 and p24 β 3 (Fig. 1A).

Although this classification is based upon sequence alignments for the whole protein, some specific features can be seen in the cytosolic C-terminal tails of the members of the different subfamilies. The cytoplasmic tail of most p24 proteins contains a pair of aromatic residues which has been shown to bind COPII subunits and thus may function as an ER export signal (Dominguez *et al.*, 1998; Contreras *et al.*, 2004b; Aniento *et al.*, 2006). Some p24 proteins also have a canonical dilysine motif which binds COPI and mediates Golgi to ER retrograde transport (Cosson and Letourneur, 1994; Letourneur *et al.*, 1994; Fiedler *et al.*, 1996; Langhans *et al.*, 2008). This is the case for mammalian p25 proteins (p24 α 1–p24 α 3), which contain a dilysine motif in the optimal position (-3,-4) for COPI binding (Teasdale and Jackson, 1996; Dominguez *et al.*, 1998). This causes these proteins to locate mainly to the ER or the ERGIC in mammalian cells (Wada *et al.*, 1991; Dominguez *et al.*, 1998; Lavoie *et al.*, 1999; Marzioch *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000, 2003). Mammalian p23 (p24 δ 1) has an additional C-terminal residue, which brings the dilysine motif into a suboptimal position for COPI binding, and mainly localizes to the CGN (Nickel *et al.*, 1997; Rojo *et al.*, 1997, 2000; Blum and Lepier, 2008). In mammalian p24 (p24 β 1), lysines are replaced by arginines (p24), which do not bind coatamer (Cosson and Letourneur, 1994; Contreras *et al.*, 2004a). As a result, this protein does not localize to the ER but is usually found in the Golgi apparatus (Dominguez *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 1999; Gommel *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000). Interestingly, all *Arabidopsis* p24 proteins of the delta subfamily (p24 δ 3–p24 δ 11) contain a C-terminal tail with the characteristics of mammalian p25 (p24 α 1–p24 α 3) proteins, including a dilysine motif in the -3,-4 position and a diaromatic/large

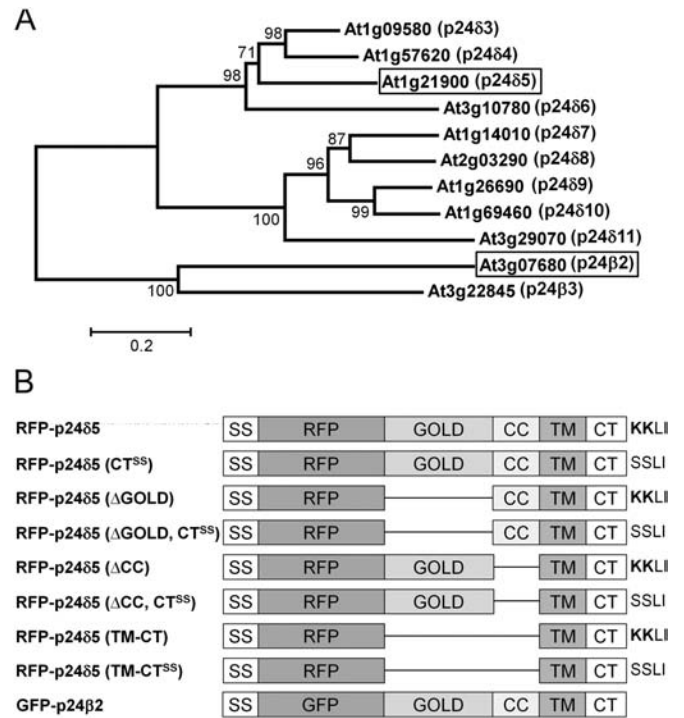


Fig. 1. The p24 family in *Arabidopsis*. (A) A phylogenetic tree containing the δ and β subfamilies of p24 proteins in *Arabidopsis*. A multiple alignment of the p24 proteins was constructed using ClustalW and the tree was generated from this alignment using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (MEGA, version 5.03) with the Neighbor–Joining method. The numbers beside the branches represent bootstrap percentage based on 1000 replications. The names assigned to these proteins, following the nomenclature proposed by Dominguez *et al.* (1998), are shown next to the AGI code. The two proteins analysed in this study, p24 δ 5 and p24 β 2, are highlighted. (B) Schematic representation of the RFP–p24 δ 5 and GFP–p24 β 2 constructs used in this study, including the different domains of p24 δ 5 and p24 β 2. SS, signal sequence; RFP/GFP, red or green fluorescent proteins; GOLD, domain involved in Golgi dynamics (see text for details); CC, coiled-coil domain; TM, transmembrane domain; CT, cytoplasmic tail, which in p24 δ 5 contains a dilysine (KKXX) motif; CT^{SS}, cytoplasmic tail with the two lysines replaced by serines; Δ GOLD or Δ CC, deletion mutants lacking the GOLD or the CC domains; TM-CT, deletion mutant containing only the transmembrane domain and the cytosolic tail.

hydrophobic motif in the -7,-8 position. One of them, p24 δ 5, has been shown to localize exclusively to the ER in the steady state (Langhans *et al.*, 2008).

Numerous functions have been ascribed to p24 proteins, including quality control of protein movement through the secretory pathway (Wen and Greenwald, 1999; Belden and Barlowe, 2001), cargo protein selection and packaging into transport vesicles (Schimmöller *et al.*, 1995; Muniz *et al.*, 2000; Takida *et al.*, 2008; Castillon *et al.*, 2011; Fujita *et al.*, 2011), the formation of ER exit sites (ERESs), and the biogenesis and maintenance of the Golgi apparatus (Lavoie *et al.*, 1999; Mitrovic *et al.*, 2008; Koegler *et al.*, 2010).

These few examples indicate that p24 proteins are one of the most interesting groups of proteins involved in regulating the structure and function of the organelles of the secretory pathway. A cargo receptor function for p24 proteins has often been suggested (see, for example, Schimmoller *et al.*, 1995), but the identity of putative cargoes has remained elusive. Indeed, only two types of cargoes have been shown to interact with p24 proteins, none of them being a real soluble cargo (as originally postulated). These are glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins, both in yeast (Schimmoller *et al.*, 1995; Muniz *et al.*, 2000, 2001; Castillon *et al.*, 2011; Fujita *et al.*, 2011) and in mammals (Takida *et al.* 2008), and G protein-coupled receptors (protease-activated receptors PAR-1 and PAR-2, nucleotide P2Y receptors, and μ -opioid receptors) (Luo *et al.*, 2007, 2011).

Despite the difficulty in the identification of the cargoes, p24 proteins have been shown recently to be involved in a variety of specific functions in animal cells, including early embryonic mouse development (Denzel *et al.*, 2000) and morphogenesis of the mouse embryo and placenta (Jerome-Majewska *et al.*, 2010), insulin biosynthesis and subsequent secretion in pancreatic beta cells (Zhang and Volchuk, 2010), or amyloid precursor metabolism and pathogenesis of Alzheimer disease (Chen *et al.*, 2006; Vetrivel *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2010). In addition, several studies have recently been performed investigating the role of p24 proteins in the secretory pathway of *Xenopus laevis* (Strating and Martens, 2009; Strating *et al.*, 2010) and *Drosophila* (Buechling *et al.*, 2011; Port *et al.*, 2011). Therefore, p24 proteins are emerging as very important players in many cellular processes in mammalian cells dependent upon the secretory pathway. In contrast, very little work has been performed on p24 proteins in plants. Only three papers have been published so far: two examining the roles of COPI- and COPII-binding motifs in the cytosolic tail of an *Arabidopsis thaliana* p24 protein (At1g21900) (here named p24 δ 5), the other demonstrating that this protein is localized to the ER as a consequence of highly efficient COPI-based recycling from the Golgi apparatus (Contreras *et al.*, 2004a, b; Langhans *et al.*, 2008). Given the peculiarities of the p24 family and also the different organization of the early secretory pathway in plants, it was deemed necessary to investigate in further detail the localization and trafficking properties of *Arabidopsis* p24 proteins, as a first step towards their functional characterization.

Following up on previous studies (Contreras *et al.*, 2004a, b; Langhans *et al.*, 2008), the localization of endogenous p24 proteins in *Arabidopsis*, including that of a member of each of the two subfamilies (p24 δ 5 and p24 β 2), has now been investigated. It was found that p24 δ 5 localizes mainly to the ER but also to the *cis*-Golgi, while p24 β 2 localizes mainly to the Golgi apparatus. In addition the relative contributions of the cytosolic tail and the luminal (GOLD and coiled-coil) domains to p24 δ 5 trafficking have been characterized. It was found that the cytosolic tail, containing the dilysine motif, is alone sufficient for ER localization at steady state and trafficking of p24 δ 5 in the early secretory pathway, while the

luminal domains may contribute to its transport beyond the Golgi apparatus. Finally, data are presented which suggest that p24 δ 5 and p24 β 2 interact with each other and exhibit coupled trafficking at the ER–Golgi interface.

Materials and methods

Plant material

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) and T-DNA mutant plants were grown in growth chambers as previously described (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). For immunogold electron microscopy, seedlings were grown on Murashige and Skoog (MS) medium containing 0.5% agar, and the roots were harvested after 5 d. To obtain a membrane fraction from *Arabidopsis* roots, seedlings were grown in liquid MS medium for 15 d. *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures (LT87) (Axelos *et al.*, 1992) were cultivated as described (Ortiz-Zapater *et al.*, 2006). Tobacco plants (*Nicotiana tabacum* var. SR1) were grown as described (Pimpl *et al.*, 2006).

Recombinant plasmid production

The coding sequence of green fluorescent protein (GFP)–p24 β 2 was commercially synthesized *de novo* (Geneart AG) based on the sequence of GFP and that of the *Arabidopsis* p24 protein At3g07680 (p24 β 2). The sequence of the fluorophore is behind the coding sequences of the p24 signal sequence (SS) and the 5' extreme end of the mature p24 coding sequence. The Δ CC, Δ GOLD, Δ CC-CT^{SS}, Δ GOLD-CT^{SS}, TMCT, and TMCT-CT^{SS} mutants of red fluorescent protein (RFP)–p24 δ 5 were obtained by 3' deletion of RFP–p24 δ 5 and synthesis of a new sequence (Langhans *et al.*, 2008). The coding sequences of XFP–p24 β 2/ δ 5 were cloned into the pBP30 vector (carrying the ³⁵S promoter, Nebenführ *et al.*, 1999) through *Bgl*III/*Not*I.

Plasmids encoding marker proteins were: RFP–p24 δ 5 and RFP–p24 δ 5-CT^{SS} (mutant1) (Langhans *et al.*, 2008), ST–yellow fluorescent protein (YFP) (Brandizzi *et al.*, 2002), Man1–RFP and Man1–GFP (Nebenführ *et al.*, 1999), GFP–HDEL (Nebenführ *et al.*, 2000), ARA6–RFP (Ueda *et al.*, 2004), GFP–BP80 (daSilva *et al.*, 2005), and ARF1(Q71L) (Pimpl *et al.*, 2003). All RFP-tagged proteins were tagged with monomeric RFP (mRFP) to prevent oligomerization. Similarly, only mGFP5 was used for GFP-tagged proteins.

Isolation of protoplasts and transient gene expression

Mesophyll protoplasts from *N. tabacum* var. SR1 leaf cells were isolated and transfected as previously described (Bubeck *et al.*, 2008). Unless otherwise stated, 1–50 μ g of plasmid DNA was transfected and expressed for 20 h. Protoplasts from *A. thaliana* (LT87) cell suspension cultures were isolated as previously described (Axelos *et al.*, 1992).

Generation of antibodies

Rabbit antibodies against different *Arabidopsis* p24 proteins were generated by Eurogentec (Belgium, <http://www.eurogentec.com>) using as antigen peptides corresponding either to the N- or to the C-terminus of the indicated proteins: p24 δ 5-Ct (YLKRYFH-KKKLI), p24 δ 5-Nt (IWLTIPTTGG), p24 β 2-Nt (IRFVIDREE), and p24 β 2-Ct (LFRKLGMSRV). Affinity-purified antibodies (Eurogentec) were used for immunogold labelling as well as for covalent binding to magnetic beads in co-immunoprecipitation experiments (see below).

Confocal microscopy and immunofluorescence labelling

Imaging was performed using a Zeiss Axiovert LSM510 Meta confocal laser scanning microscope. At the Metadetector, the main beam splitters (HFT) 458/514 and 488/543 were used. The following fluorophores (excited and emitted by frame switching in the multitracking mode) were used: GFP (488 nm/496–518 nm), YFP (514 nm/529–550 nm), and RFP (543 nm/593–636 nm). To verify the co-localization of fluorescent signals obtained by fast frame switching, parallel observations were performed in the line switching mode. As shown in Supplementary Fig. S8 available at *JXB* online, there was no difference in the localization of the fluorescent signals, thus eliminating possible false co-localization events caused by the movement of organelles. Post-acquisition image processing was performed using the Zeiss LSM 5 image Browser (4.2.0.121) and CorelDrawX4 (14.0.0.567) or ImageJ (v.1.45m).

Immunogold electron microscopy

Root tips from *Arabidopsis* were high pressure frozen, freeze substituted, embedded, labelled, and post-stained as described (Bubeck *et al.*, 2008). Affinity-purified antibodies were used at the following dilutions: Ct-p24 β 2 (1:100); Nt-p24 δ 5 (1:10); and Ct-p24 δ 5 (1:10). Micrographs were taken with a JEM1400 transmitting electron microscope operating at 80 kV using a TVIPS F214 digital camera.

Preparation of membrane extracts and co-immunoprecipitation

Membrane fractions were obtained from *Arabidopsis* cell suspension cultures (LT87) or from *Arabidopsis* roots. Cells were collected by centrifugation and washed twice in homogenization buffer [50 mM TRIS-HCl, pH 7.5, 0.3 M sucrose, 10 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 3 mM EDTA, and a cocktail of protease inhibitors (Sigma)]. Pellets were resuspended 1:1 (v/v) in homogenization buffer and cells disrupted by sonication (4 \times 15 s). Cell extracts were separated from unbroken cells by centrifugation (10 min at 2000 g). Membranes were pelleted by centrifugation of the extracts for 1 h at 150 000 g. *Arabidopsis* roots (from either wild-type or mutant plants) were homogenized in homogenization buffer using a mortar and a pestle, and membrane fractions were obtained as above. Membrane pellets were extracted using a lysis buffer containing 50 mM TRIS-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.5% Triton X-100, and a cocktail of protease inhibitors (30 min at 4 °C), and extracts were obtained after centrifugation for 5 min at 10 000 g. Protein extracts were used for SDS-PAGE followed by western blot analysis or for co-immunoprecipitation. The intensity of the bands obtained after western blot was quantified using the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories).

Co-immunoprecipitation experiments were performed using magnetic beads (Dyna, Invitrogen), following the recommendations of the manufacturer. Briefly, affinity-purified antibodies were covalently bound to magnetic beads (6 μ g of antibody mg⁻¹ Dynabeads). Then 150 μ l (1.5 mg) of Dynabeads (with bound antibody) were incubated with 1 ml of protein extracts from membrane fractions obtained from cell suspension cultures (10 mg ml⁻¹) for 2 h at 4 °C. Beads were washed three times with lysis buffer and bound proteins were eluted with elution buffer (buffering salts, pH 2.8, Dynal).

Mutant characterization

Lines (Col-0 background) containing a T-DNA insertion in *p24 δ 4* (SAIL_664_A06, *p24 δ 4-1*) and *p24 δ 5* (SALK_016402C, *p24 δ 5-1*) were identified from the SALK T-DNA collection (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). They were characterized by PCR as previously described (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). The primers used for the *p24 δ 4* mutant (*p24 δ 4-1*) were the following: 5'GGATCCACTTAGATCTCCTCAAAATTC3' and 5'ATACTGTACCATGC-GACTCTCGAG3'. The T-DNA left border primer used was 5'TTCATAACCAATCTCGATACAC3'. The primers used for the

p25 δ 5 mutant (*p25 δ 5-1*) were 5'GAAGACCATCGTTGTTCTCC-GATGGC3' and 5'TTGGTGATGAAGATTGTTCCC3'. The T-DNA left border and *Actin7* (*ACT7*, At5g09810) primers used were described previously (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). Reverse transcription-PCR (RT-PCR) analysis of *p24 δ 4-1* and *p24 δ 5-1* mutants was performed as described (Ortiz-Masia *et al.*, 2007) to show the absence of *p24 δ 4* and *p24 δ 5* mRNA, respectively. The primers used for PCR amplification were the same as above. To generate the double mutant, the homozygous line *p24 δ 4-1* was crossed with the homozygous line *p24 δ 5-1*. Individuals homozygous for T-DNA insertion in both *p24 δ 4-1* and *p24 δ 5-1* were identified by PCR with the primers described above.

Results

Localization of endogenous p24 proteins in Arabidopsis

In order to localize endogenous p24 proteins in *Arabidopsis*, peptide antibodies against two different members of the p24 family were generated. Since previous work (Contreras *et al.*, 2004a, b; Langhans *et al.*, 2008) was undertaken with p24 δ 5 (At1g21900) (Fig. 1A), this protein was chosen as one representative of the delta subfamily for antibody generation. Moreover, it has relatively high levels of expression in different tissues, according to gene expression data of public microarray repertoires (Zimmermann *et al.*, 2004). Antibodies were produced using peptides corresponding to both the N- and the C-terminus of p24 δ 5. In contrast to the N-terminus, the C-terminus of *Arabidopsis* p24 proteins is very similar among different members of the delta subfamily (Supplementary Fig. S1 at *JXB* online). In particular, the C-termini of p24 δ 3, p24 δ 4, and p24 δ 6 share 10–11 (out of 12) residues with the C-terminus of p24 δ 5, while sequence homology is lower in other members of the subfamily. Therefore, C-terminal p24 δ 5 antibodies may also recognize p24 δ 3, p24 δ 4, and p24 δ 6. According to public microarray databases, p24 δ 4 has expression levels comparable (although lower) with those of p24 δ 5, while p24 δ 6 expression is very low and tissue specific (no data are available for p24 δ 3). Antibodies against both the N- and the C-terminus of a p24 protein of the beta subfamily, p24 β 2 (At3g07680), were also generated (Fig. 1A; Supplementary Fig. S1).

p24 proteins were extracted from membranes of *Arabidopsis* cell suspension cultures or from *Arabidopsis* roots. As shown in Fig. 2A, antibodies against the N-terminus of p24 δ 5 recognized a protein of the expected molecular weight (24 kDa) in membranes from cell suspension cultures as well as in membranes from roots. In the case of p24 δ 5 C-terminal antibodies, a major band of ~24 kDa was obtained in membranes from cell suspension cultures, although a double band was detected in root membranes. To characterize the specificity of the antibodies further, available T-DNA insertion mutants for p24 δ 5 (*p24 δ 5-1*) and p24 δ 4 (*p24 δ 4-1*) were used. Both mutants were found to be knock-out mutants. In addition, the *p24 δ 4 δ 5* double mutant was obtained. Plants from the three lines resembled wild-type plants under standard growth conditions, either on vertical agar plates or on soil (Supplementary Fig. S2 at *JXB* online).

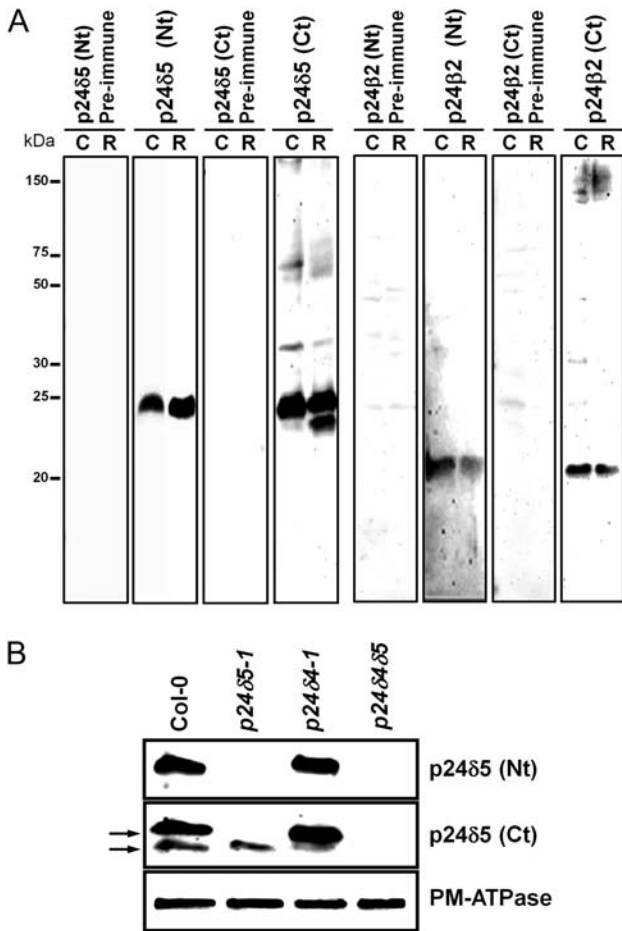


Fig. 2. Characterization of p24 antibodies. (A) Characterization of antibodies against *Arabidopsis* p24 proteins. Protein extracts were obtained from membranes of *Arabidopsis* cell suspension cultures (C) or *Arabidopsis* roots (R), as described in the Materials and methods, and analysed by SDS–PAGE and western blotting with affinity-purified antibodies against the p24δ5 N-terminus, p24δ5 C-terminus, p24β2 N-terminus, and p24β2 C-terminus, or with the corresponding pre-immune sera. (B) Western blot analysis of membranes from wild-type (Col-0) or p24 knock-out mutants (*p24δ5-1*, *p24δ4-1*, or *p24δ4δ5*) using antibodies against the Nt or the Ct of p24δ5. A 25 µg aliquot of protein was loaded in each lane. Western blot with an antibody against the plasma membrane (PM) ATPase was used as a loading control.

Western blot analysis with the Nt-p24δ5 antibody showed that p24δ5 was absent in root membranes from the *p24δ5-1* mutant or from the *p24δ4δ5* double mutant, as expected for a p24δ5 knock-out mutant, but was present (at similar levels to those in the wild type) in the *p24δ4-1* mutant (Fig. 2B). These mutants were next analysed with the Ct-p24δ5 antibody, which detected two bands in extracts from wild-type root membranes. The upper band should correspond specifically to p24δ5, as it was absent in root membranes from the *p24δ5-1* mutant or from the *p24δ4δ5* double mutant, confirming the results obtained with the N-terminal antibody, but was present in the *p24δ4-1* mutant (Fig. 2B). In contrast, the lower band was still present in the *p24δ5-1* mutant but was almost undetectable in the *p24δ4δ5* double mutant (Fig. 2B). This

suggests that the lower band detected by the Ct-p24δ5 antibody corresponds to a large extent to p24δ4, and that the Ct-p24δ5 antibody does not recognize any other abundant member of the delta subfamily in *Arabidopsis* roots. Finally, antibodies against both the N- and the C-terminus of p24β2 recognized a protein with an apparent molecular weight of ~22 kDa (instead of the predicted 24 kDa) (Fig. 2A).

These antibodies were used to localize endogenous p24 proteins by immunogold labelling on sections cut from cryofixed *Arabidopsis* roots. As shown in Fig. 3A and B, the N-terminal p24δ5 antibody produced a prominent labelling on ER membranes. Occasionally, some labelling was also seen on the *cis*-Golgi or on putative COPI vesicles (Fig. 3B; see also Table 1). In contrast, the N-terminal p24β2 antibody showed significantly higher labelling at the Golgi apparatus, although some labelling could also be seen at ER membranes (Fig. 3C–E; see also Table 1). The C-terminal p24δ5 antibody was also used to localize endogenous p24δ proteins in p24δ5 (Fig. 4A, C, D) and p24δ4 (Fig. 4B, E) knock-out mutants. As stated above, the Ct-p24δ5 antibody should recognize p24δ5 (in the p24δ4 knock-out mutant) and p24δ4 (in the p24δ5 knock-out mutant). In both mutant lines, labelling was again found at ER membranes, but also a significant labelling at the *cis* side of the Golgi apparatus. The labelling obtained with the Ct-p24δ5 antibody in both mutant lines was very similar to that observed in wild-type *Arabidopsis* roots (Fig. 4F–H), suggesting that the localization of endogenous p24δ5 or p24δ4 is not significantly affected by the absence of p24δ4 or p24δ5, respectively.

The dilysine motif in the cytoplasmic tail of p24δ5 is sufficient for its trafficking in the early secretory pathway

It was previously demonstrated that transiently expressed RFP–p24δ5 shows a uniform signal distribution throughout the ER, both in tobacco mesophyll and in *Arabidopsis* protoplasts (Langhans *et al.*, 2008), as well as in BY2 cells (Langhans *et al.*, 2008) and in tobacco leaf epidermal cells (Lerich *et al.*, 2011). Whether the dilysine motif at the cytoplasmic tail of p24δ5 is sufficient for ER localization and trafficking in the early secretory pathway, or if the luminal GOLD and coiled-coil domains could also play a role has now been investigated. To this end, RFP–p24δ5 deletion mutants lacking either the GOLD or the coiled-coil domains were prepared (Fig. 1B). These constructs were used for transient expression in tobacco mesophyll protoplasts, since they represent a versatile, well-characterized, and reproducible system for transient expression (Pimpl and Denecke, 2001; da Silva *et al.*, 2006; Ribeiro *et al.*, 2008). Nevertheless, the localization of the different constructs was also confirmed in *Arabidopsis* protoplasts (see below). As shown in Fig. 5A and B, both deletion mutants localized exclusively to the ER, where they co-localized extensively with the ER marker GFP–HDEL. This suggests that the steady-state localization of RFP–p24δ5 at the ER is not dependent on the GOLD or the coiled-coil domains. A deletion mutant lacking both the GOLD and the coiled-coil domains (and thus having only the transmembrane

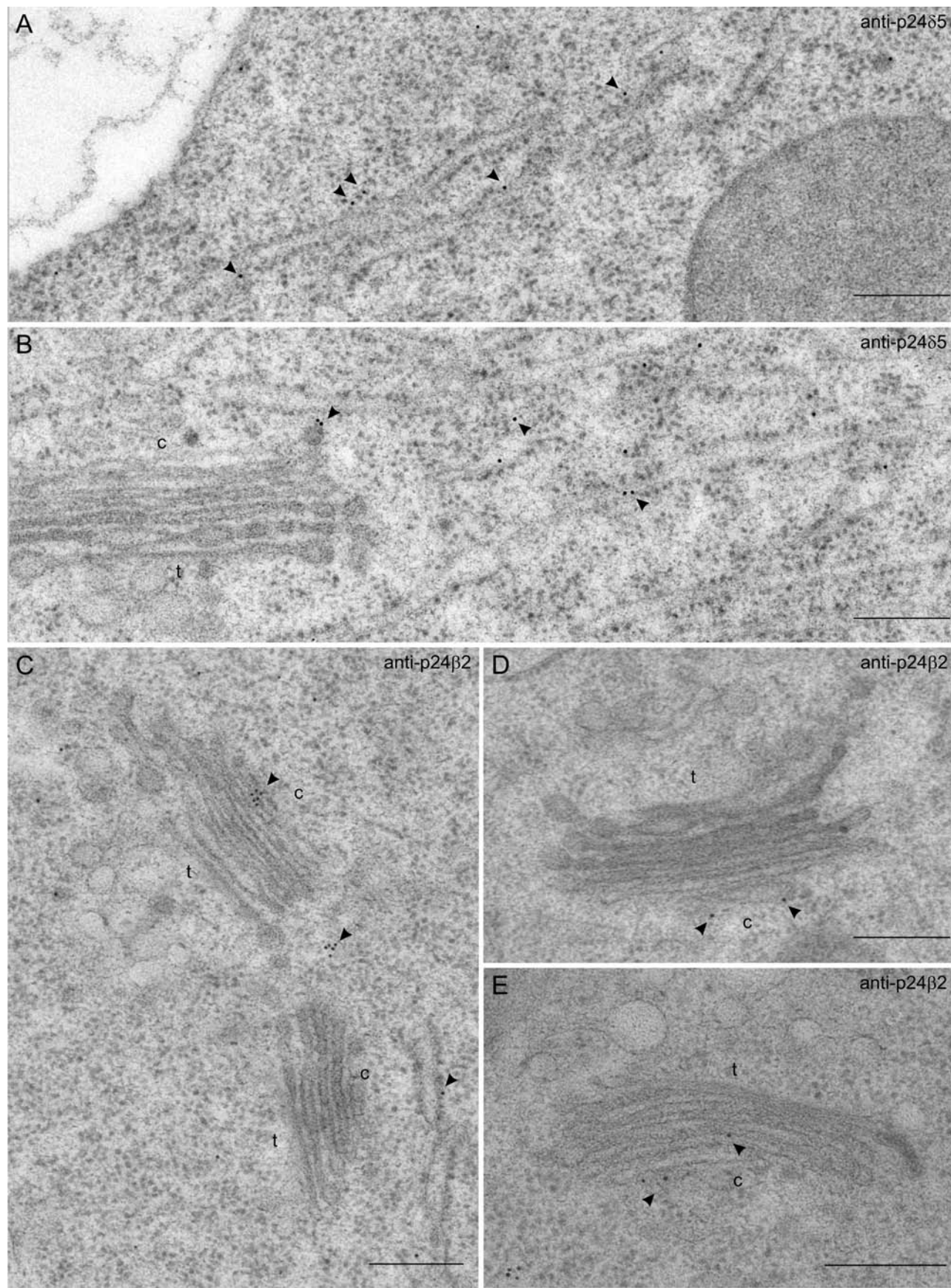


Fig. 3. Localization of p24 δ 5 and p24 β 2 by immunogold labelling on cryofixed *Arabidopsis* roots. (A and B) Labelling with antibodies against Nt-p24 δ 5 at the ER (A and B) and at a putative COPI vesicle (B). (C–E) Labelling with antibodies against Ct-p24 β 2 at the Golgi (C–E) and at the ER (C). Arrowheads point to gold particles. c, cis-Golgi; t, trans-Golgi. Scale bars=300 nm.

Table 1. p24 immunogold labelling in wild-type Arabidopsis root cells

Antibody	Gold particles over ER	Gold particles over Golgi Stack	Gold particles over mitochondria
Nt-p24 $\delta 5^a$	48	12	6
Ct-p24 $\beta 2^b$	23	57	7

^a Number of micrographs analysed: 10.

^b Number of micrographs analysed: 14.

domain and the cytosolic tail), RFP-p24 $\delta 5$ (TM-CT) (Fig. 1B), also localized exclusively to the ER (Fig. 5C), indicating that the dilysine motif in the cytosolic tail constitutes the minimal requirement for the steady-state localization of RFP-p24 $\delta 5$ to the ER. The same ER localization was obtained when these constructs were expressed in *Arabidopsis* protoplasts (Supplementary Fig. S3A–F at JXB online). Furthermore, this ER localization was not a consequence of overexpression, since all constructs localized to the ER even at very low expression levels (Supplementary Fig. S4). It was also tested whether GOLD or coiled-coil domains were involved in anterograde ER to Golgi transport of RFP-p24 $\delta 5$. To this end, the three deletion mutants were co-expressed with the ARF1(Q71L) mutant, in order to inhibit retrograde Golgi to ER transport (Langhans *et al.*, 2008). In this case, RFP-p24 $\delta 5$ deletion mutants still localized to the ER, but also to Golgi-like punctae, where they co-localized with the Golgi marker Man1-GFP (Fig. 5D–F), as was the case for RFP-p24 $\delta 5$ (Langhans *et al.*, 2008). Therefore, the GOLD and coiled-coil domains do not seem to have an influence on trafficking and localization of RFP-p24 $\delta 5$ in the early secretory pathway, at least when expressed individually.

The luminal domain may be involved in transport of p24 $\delta 5$ beyond the early secretory pathway

In mammals, the luminal domain of p24 proteins has been proposed to play a role in trafficking of p23 (p24 α) to the cell surface (Blum and Lepier, 2008). It was previously found that RFP-p24 $\delta 5$ mutants lacking the dilysine motif were no longer present at the ER but were transported downstream to the pre-vacuolar compartment (PVC) and the vacuole (Langhans *et al.*, 2008). Therefore, it was decided to investigate whether the GOLD and/or the coiled-coil domains could play a role in RFP-p24 $\delta 5$ trafficking in the absence of the dilysine motif. To this end, RFP-p24 $\delta 5$ deletion mutants with a mutated dilysine motif (CT^{SS}) lacking either the GOLD or the coiled-coil domains were prepared (Fig. 1B). As shown in Fig. 5G, H, J, and K, none of these mutants was found at the ER. In contrast, they localized to the Golgi (as shown by co-localization with ST-YFP), the PVC (as shown by co-localization with GFP-BP80), and the vacuole lumen. The dilysine mutant lacking the GOLD domain had a more prominent vacuolar labelling than the dilysine mutant lacking the coiled-coil

domain (Fig. 5G, H, J, K). This suggests that the coiled-coil domain facilitates transport of dilysine mutants to the vacuole. To quantify the contribution of the coiled-coil domain and to investigate whether transport of dilysine mutants to the vacuole correlated with their degradation, the levels of the different constructs were analysed by western blotting with an RFP antibody. As shown in Fig. 6, when compared with those of RFP-p24 $\delta 5$, the levels of RFP-p24 $\delta 5$ (CT^{SS}) were very low, although the same amounts of DNA were used for transient expression. These data suggest that once synthesized, RFP-p24 $\delta 5$ (CT^{SS}) is degraded, probably as a consequence of its transport to the vacuole, as had been previously proposed (Langhans *et al.*, 2008). In contrast, the levels of the dilysine mutant lacking the coiled-coil domain [RFP-p24 $\delta 5$ (Δ CC, CT^{SS})] were significantly higher, suggesting that a reduced transport to the vacuole may correlate with a reduced degradation (Fig. 6).

Finally, a dilysine mutant lacking both the GOLD and the coiled-coil domains (RFP-p24 $\delta 5$, TM-CT^{SS}) was used. As shown in Fig. 5I and L, this was the only dilysine mutant which was partially localized to the ER, showing a partial co-localization with the ER marker GFP-HDEL. It also showed co-localization with the Golgi marker Man1-GFP and eventually with GFP-BP80 (data not shown), but was rarely seen in the vacuole lumen. Altogether, it seems that the absence of the luminal domain impairs trafficking from the ER to the Golgi, and downstream to the PVC and the vacuole. The lower vacuolar labelling (and increased protein levels) obtained in the dilysine mutant lacking the coiled-coil domain suggests that this domain is important in trafficking beyond the Golgi apparatus.

Trafficking properties of a p24 protein of the beta subfamily and coupled transport of Arabidopsis p24 proteins

The localization and trafficking properties of a member of the beta subfamily, p24 $\beta 2$ (Fig. 1A), have also been investigated. To this end, a fusion construct similar to the one used to investigate *in vivo* trafficking and localization of RFP-p24 $\delta 5$, but with GFP instead of RFP, was prepared (Fig. 1B). Surprisingly, the GFP signal obtained upon expression of GFP-p24 $\beta 2$ appeared to be very low. However, GFP-p24 $\beta 2$ was not present at the ER, in contrast to RFP-p24 $\delta 5$, but showed a punctate pattern, and it co-localized partially with the Golgi marker Man1-RFP, in both tobacco mesophyll (Fig. 7A–C) and *Arabidopsis* protoplasts (Fig. 7G–I), but not with the PVC marker ARA6-RFP (Fig. 7D–F).

Interestingly, when co-expressed with RFP-p24 $\delta 5$, the signal of GFP-p24 $\beta 2$ was clearly more intense and localized to punctae. In addition, it was observed that RFP-p24 $\delta 5$, which showed its typical ER pattern, also localized to the same punctae under these conditions (Fig. 8A–C). An increased ratio in the concentrations of GFP-p24 $\beta 2$ versus RFP-p24 $\delta 5$ induced a progressive change in the localization of RFP-p24 $\delta 5$, from its typical reticulate ER pattern to a mostly punctuated one, and increased co-localization

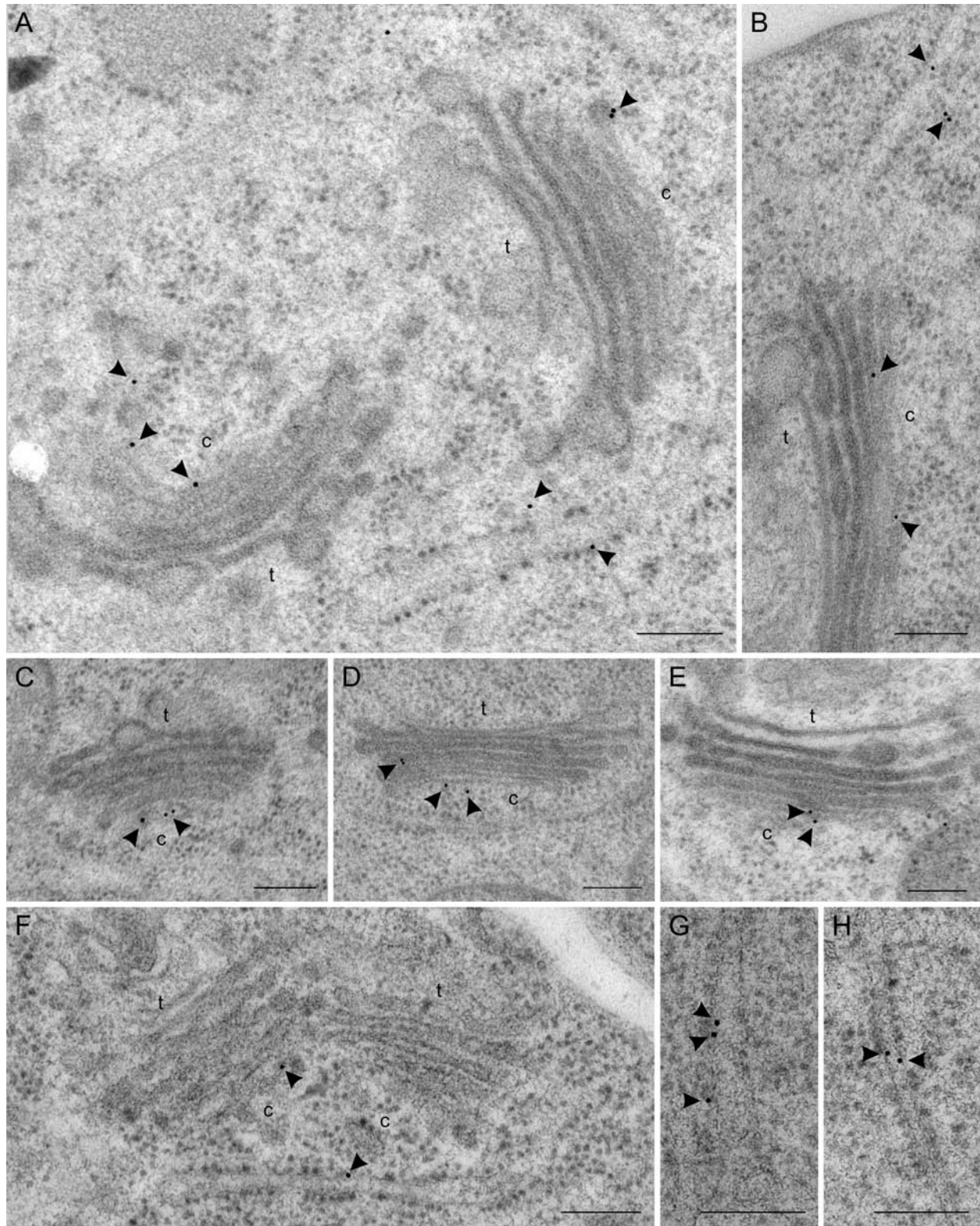


Fig. 4. Localization of p24 δ proteins by immunogold labelling on cryofixed wild-type (Col-0), *p24 δ 5-1*, and *p24 δ 4-1* *Arabidopsis* roots. (A, C, and D) Labelling with Ct-p24 δ 5 antibodies in roots from the *p24 δ 5-1* mutant. (B and E) Labelling with Ct-p24 δ 5 antibodies in roots from the *p24 δ 4-1* mutant. (F, G, and H) Labelling with Ct-p24 δ 5 antibodies in wild-type (Col-0) *Arabidopsis* roots. Arrowheads point to gold particles. c, cis-Golgi; t, trans-Golgi. Scale bars=300 nm.

between both proteins (Fig. 8D–F; Supplementary Fig. S5 at *JXB* online). This suggests that GFP-p24 β 2 is able to interact with RFP-p24 δ 5 and is transported with the latter

out of the ER. This co-localization was also observed when both proteins were expressed in *Arabidopsis* protoplasts (Supplementary Fig. S3G–I).

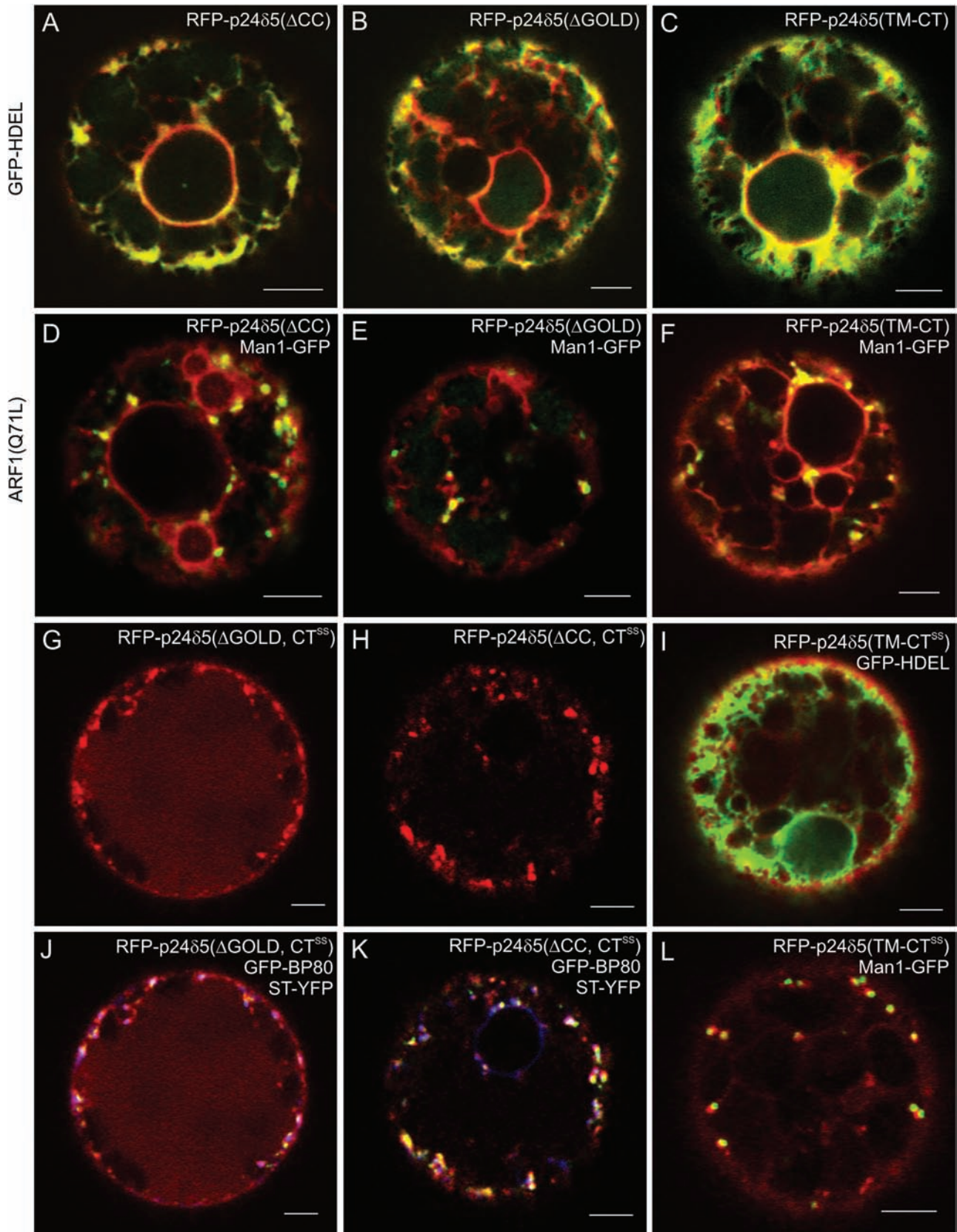


Fig. 5. RFP-p24 δ 5 deletion mutants localize to the ER but cycle between the ER and the Golgi, whilst mutants lacking the dilysine motif are transported to the pre-vacuolar compartment and the vacuole. (A–L) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–C) RFP-p24 δ 5 deletion mutants lacking the coiled-coil domain (Δ CC) (A), the GOLD domain (Δ GOLD) (B), or both (TM-CT) (C) show a typical ER pattern and co-localize with the ER marker GFP-HDEL. (D–F) RFP-p24 δ 5 deletion mutants lacking the coiled-coil domain (Δ CC) (D), the GOLD domain (Δ GOLD) (E), or both (TM-CT) (F) co-localize partially with Man1-GFP in Golgi-like punctae upon

To test whether p24 δ 5 interacts with p24 β 2 via coiled-coil domains, GFP-p24 β 2 was co-expressed with a deletion mutant of RFP-p24 δ 5 lacking the coiled-coil domain (Fig. 1B). In this case, almost no co-localization was detected between both proteins (Fig. 8G–I). In addition, the signal of GFP-p24 β 2 was weak, as it happened in the absence of RFP-p24 δ 5, and RFP-p24 δ 5 (Δ CC) showed its typical ER pattern, without punctae, even in the presence of increasing concentrations of GFP-p24 β 2 (Supplementary Fig. S6 at *JXB* online). This suggests that both proteins interact with each other via their coiled-coil domain and that this interaction stabilizes overexpressed GFP-p24 β 2. To quantify whether the protein levels of GFP-p24 β 2 were indeed dependent on the interaction with RFP-p24 δ 5, protoplasts expressing these proteins were analysed by western blotting with Ct-p24 β 2 or RFP antibodies. As shown in Fig. 6, GFP-p24 β 2 was almost undetectable when expressed alone, but its levels increased enormously upon co-expression with RFP-p24 δ 5, but not with RFP-p24 δ 5 (Δ CC). On the other hand, the protein levels of RFP-p24 δ 5 seem to be independent of the presence of GFP-p24 β 2 (Fig. 6).

In order to narrow down the identity of the compartment(s) where RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 co-localize,

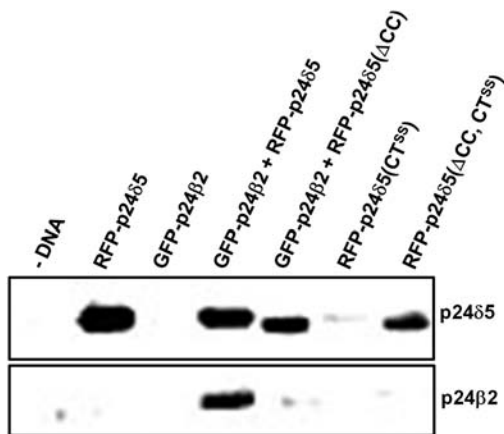


Fig. 6. Biochemical quantitation of the expression of the different constructs. Tobacco mesophyll protoplasts were electroporated in the absence (–DNA) or the presence of 30 μ g of plasmid DNAs corresponding to RFP-p24 δ 5 (and mutant versions) and/or GFP-p24 β 2. At 24 h post-electroporation, protoplasts were washed, extracted in Laemmli sample buffer, and analysed by SDS-PAGE (12% acrylamide) and western blot analysis with antibodies against RFP (to detect p24 δ 5 and mutant versions) or the p24 β 2 C-terminus. Note the lower molecular weight of the RFP-p24 δ 5 constructs lacking the coiled-coil domain. A 30 μ g aliquot of protein was loaded for each of the extracts.

RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 were co-expressed with 6 kDa VP-CFP (cyan fluorescent protein), a putative COPII/ERES marker (Lerich *et al.*, 2011). As shown in Fig. 8J–M, a high degree of co-localization was observed between the three proteins in punctate structures, suggesting that a fraction of RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 is present in COPII-labelled structures.

Whether the observed co-localization/interaction between RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 correlated with their trafficking was next investigated. To this end, both proteins were co-expressed with the ARF1(Q71L) mutant, to interfere with retrograde Golgi to ER transport. This mutant expression has been shown to redistribute RFP-p24 δ 5 partially from the ER to Golgi-like punctae (Langhans *et al.*, 2008). However, when GFP-p24 β 2 was co-expressed with the ARF1(Q71L) mutant, it showed a prominent vacuolar labelling and did not co-localize with ManI-RFP (Fig. 9A–C). This suggests that GFP-p24 β 2 localizes to the Golgi at steady state but may also cycle between the ER and Golgi. Thus, when retrograde Golgi to ER transport is blocked, the protein is then transported by default to the vacuole. In contrast, when both RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 were expressed together under the same conditions [ARF1(Q71L) mutant expression], GFP-p24 β 2 was not transported to the vacuole but co-localized in punctae with RFP-p24 δ 5 (Fig. 9D–F). This suggests that RFP-p24 δ 5 holds back GFP-p24 β 2 in the ER–Golgi interface. Since both proteins co-localize in punctate structures, it was speculated that some of these punctae may correspond to Golgi stacks. To check this, protoplasts were treated with brefeldin A (BFA). After 1 h treatment, a fraction of both proteins had redistributed to the ER, as is the case for standard Golgi marker proteins, for example ManI-(X)FP, which relocate to the ER under these conditions (Langhans *et al.*, 2011). In contrast, many of the punctate structures were BFA resistant (Fig. 9G–I) and could represent the fraction of both proteins present in COPII-labelled structures. However, it was possible to observe a redistribution of both proteins to the ER after 2 h of BFA treatment (Supplementary Fig. S7 at *JXB* online). Altogether, these experiments indicate that RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 traffic together at the ER–Golgi interface.

Interaction between p24 proteins

Since the above experiments suggested an interaction between p24 δ 5 and p24 β 2, it was decided to investigate this possibility further. Previous studies where a single member of the p24 family has been deleted or knocked-down showed that the protein levels of other family members

ARF1(Q71L) mutant expression. (G and J) An RFP-p24 δ 5 dilysine mutant lacking the GOLD domain (Δ GOLD, CT^{SS}) shows a prominent vacuolar labelling but it also co-localizes partially in punctae with Golgi (ST–YFP; blue) or PVC (GFP–BP80; green) markers. (H and K) An RFP-p24 δ 5 dilysine mutant lacking the coiled-coil domain (Δ CC, CT^{SS}) shows a weak vacuolar labelling but it also co-localizes partially in punctae with Golgi (ST–YFP; blue) or PVC (GFP–BP80; green) markers. (I and L) An RFP-p24 δ 5 dilysine mutant with the transmembrane domain and the cytoplasmic tail (TM-CT^{SS}) co-localizes partially with the ER marker GFP–HDEL and the Golgi marker ManI–GFP. Scale bars=5 μ m.

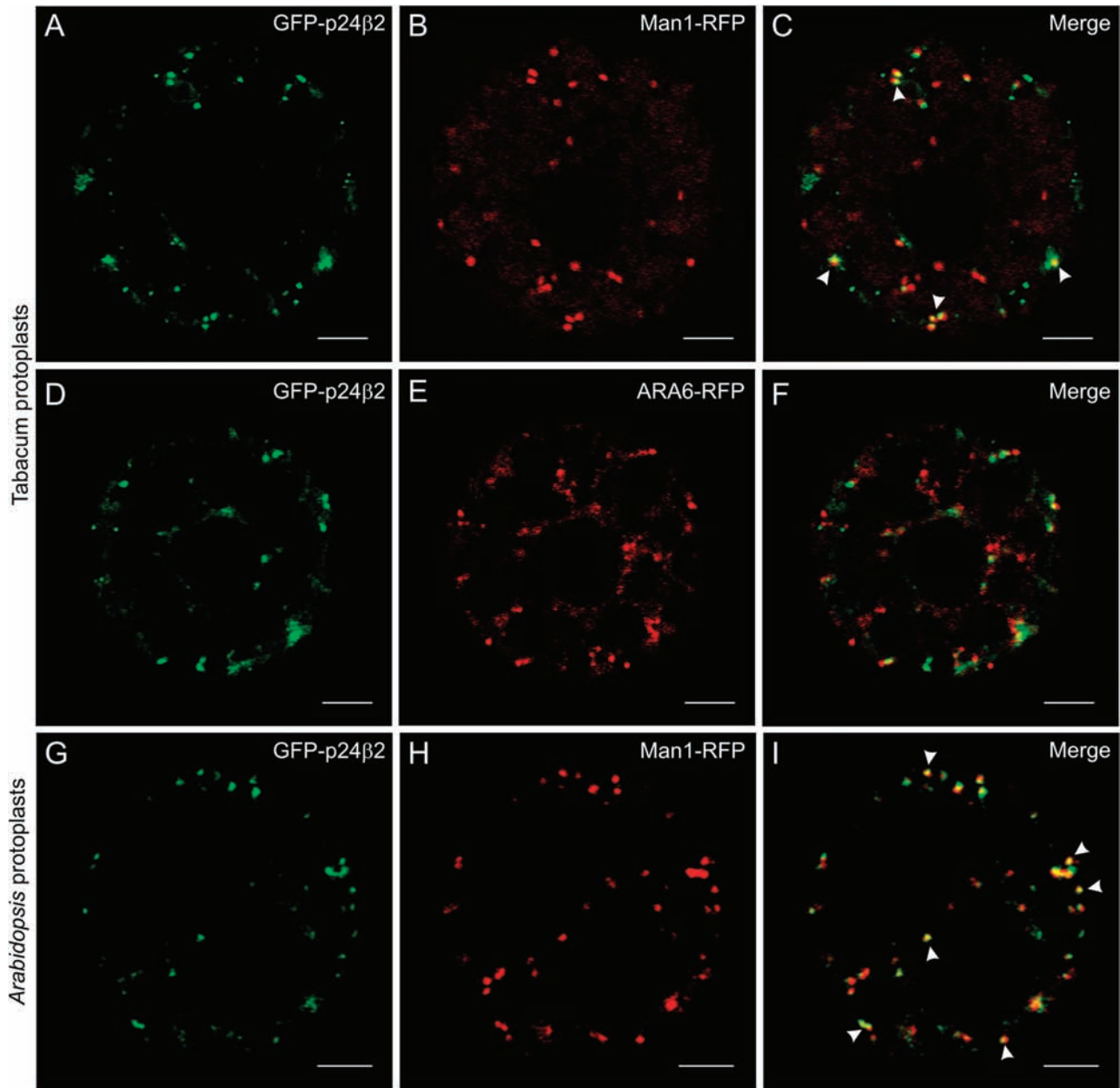


Fig. 7. Localization of GFP-p24 β 2. (A–F) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–C) GFP-p24 β 2 (A) co-localizes partially with the Golgi marker Man1–RFP (B) in punctate structures (merged image in C). (D–F) GFP-p24 β 2 (D) punctae do not co-localize with the PVC marker ARA6–RFP (E) (merged image in F). (G–I) Transient gene expression in *Arabidopsis* protoplasts. GFP-p24 β 2 (G) co-localizes partially with the Golgi marker Man1–RFP (H) in punctate structures (merged image in I). Arrowheads point to co-localizing signals. Scale bars=5 μ m.

were reduced, which probably reflects the fact that those p24 proteins interact with each other in hetero-oligomeric complexes (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch *et al.*, 1999; Denzel *et al.*, 2000; Vetrivel *et al.*, 2007; Takida *et al.*, 2008; Jerome-Majewska *et al.*, 2010; Koegler *et al.*, 2010; Zhang and Volchuk, 2010). Therefore, the protein levels of p24 β 2 in a T-DNA mutant lacking p24 δ 5 (*p24 δ 5-1*) were examined. To this end, protein extracts were analysed with Nt- and Ct-p24 β 2 antibodies. In both cases, it was found that the levels of p24 β 2 in the *p24 δ 5-1* mutant were drastically reduced (~70%) when compared with the wild

type (Fig. 10A). These results indicate that the protein levels of p24 β 2 are dependent on p24 δ 5, suggesting an interaction between these proteins.

To test biochemically for a direct interaction between endogenous p24 δ 5 and p24 β 2, co-immunoprecipitation experiments were performed. To this end, affinity-purified antibodies were covalently bound to magnetic beads and were incubated in the presence of protein extracts from membrane fractions, as described in the Materials and methods. Proteins could be immunoprecipitated with the C-terminal antibodies. Under these conditions, the corresponding proteins could be

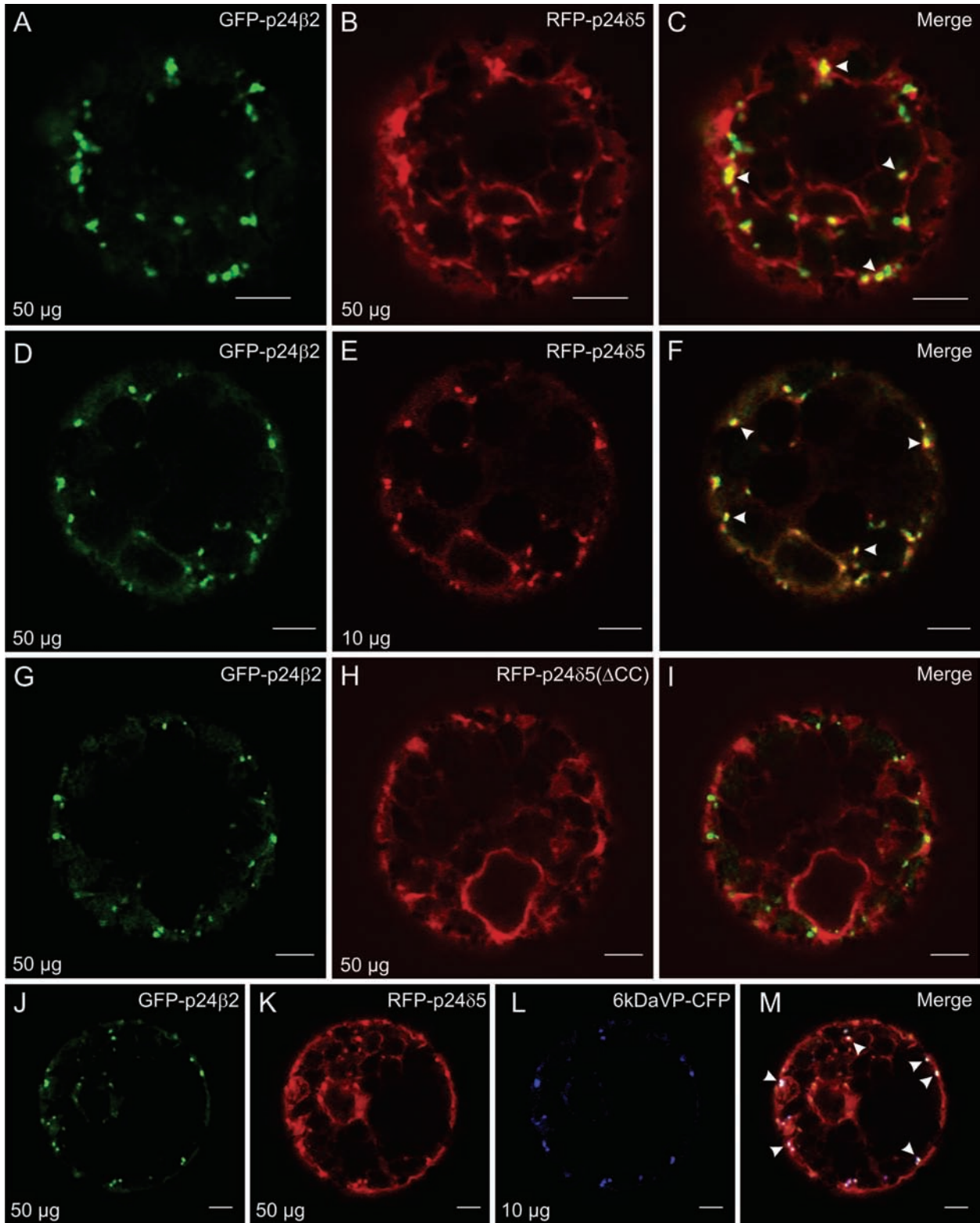


Fig. 8. GFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 5 co-localize in punctae via the coiled-coil domain. (A–M) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–F) GFP-p24 β 2 (A and D, 50 μ g) and RFP-p24 δ 5 (B, 50 μ g; E, 10 μ g) co-localize in punctate structures (see merged images in C and F). (G–I) GFP-p24 β 2 (G) and RFP-p24 δ 5 (Δ CC) (H) do not co-localize (see merged image in I). (J–M) GFP-p24 β 2 (J) and RFP-p24 δ 5 (K) show extensive co-localization with 6 kDa VP-CFP (L) in punctate structures (see merged images in M). Arrowheads point to co-localizing signals. Scale bars=5 μ m.

only immunoprecipitated with the C-terminal antibodies. As shown in Fig. 10B, antibodies against the C-terminus of p24 δ 5 immunoprecipitated p24 δ 5, as shown by western blot

analysis with antibodies against the p24 δ 5 N-terminus. More importantly, immunoprecipitates containing p24 δ 5 also contained p24 β 2. The reverse was also true:

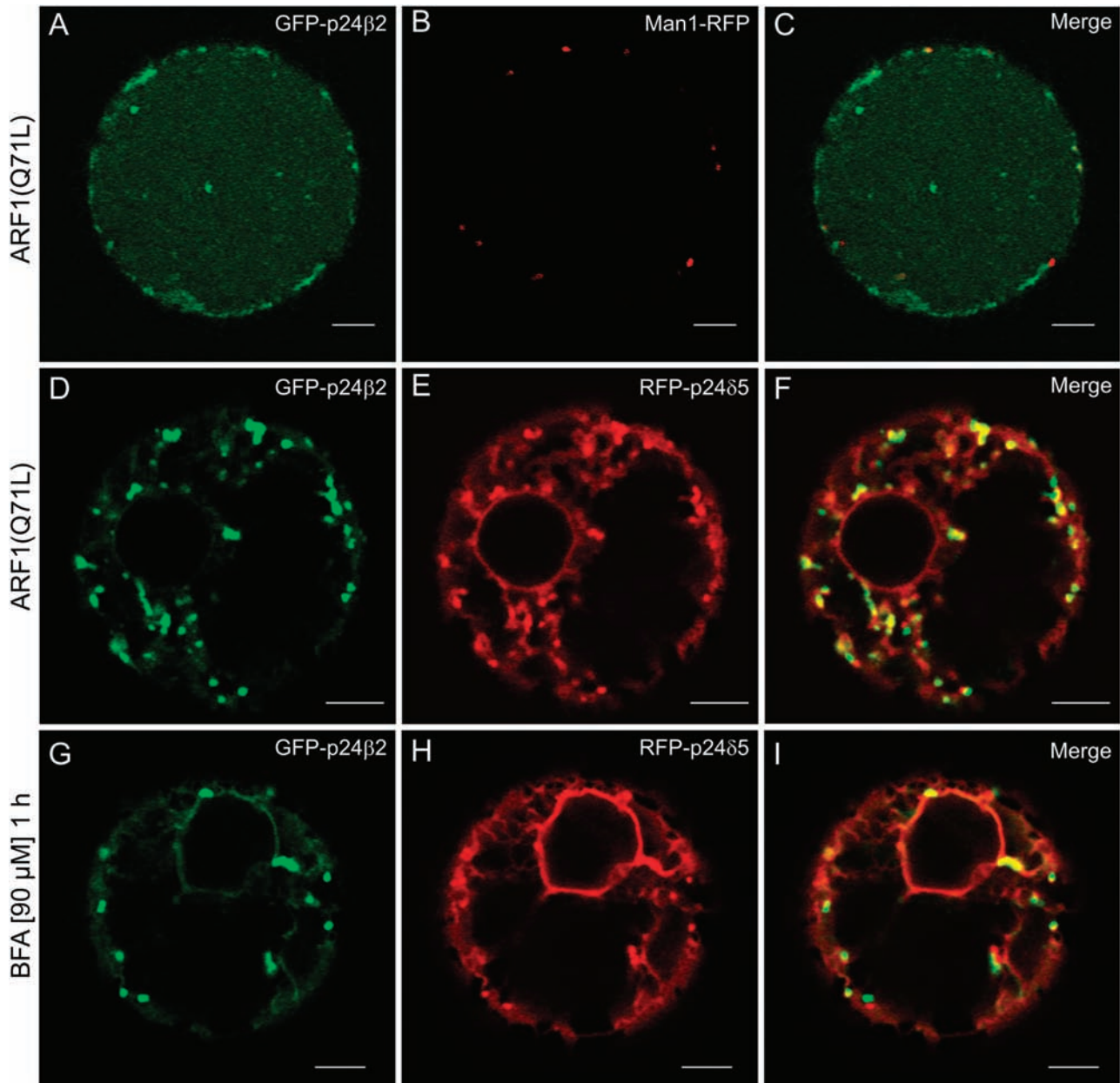


Fig. 9. Coupled trafficking of RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 at the ER-Golgi interface. (A–F) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–C) GFP-p24 β 2 (A) is transported to the vacuole upon co-expression with the ARF1(Q71L) mutant and shows no co-localization with the Golgi marker Man1-RFP (B) (merged image in C). (D–F) GFP-p24 β 2 (D) is not transported to the vacuole upon co-expression of the ARF1(Q71L) mutant in the presence of RFP-p24 δ 5 (E) but both proteins co-localize in punctate structures (see merged image in F). (G–I) Treatment with BFA (1 h, 90 μ M) after co-expression of GFP-p24 β 2 (G) and RFP-p24 δ 5 (H) induces a partial relocalization of both proteins to the ER, but many punctate structures still remain (merged image in I). Scale bars=5 μ m.

antibodies against the C-terminus of p24 β 2 immunoprecipitated p24 β 2, and these immunoprecipitates also contained p24 δ 5 (Fig. 10B). These experiments again suggest that there is a direct interaction between p24 δ 5 and p24 β 2.

Discussion

The p24 family in Arabidopsis

In contrast to animals and fungi, plants possess only representatives of the p24 δ and the p24 β subfamilies

(Carney and Bowen, 2004; Strating and Martens, 2009; Strating *et al.*, 2009). The p24 α and p24 δ subfamilies have a common origin, as is the case for the p24 β and p24 γ subfamilies. In most vertebrates, the p24 α and p24 γ subfamilies have expanded, whereas the p24 β and p24 δ subfamilies each have only a single member. Therefore, only one subfamily from each pair of evolutionarily related subfamilies (p24 α / δ and p24 β / γ) has expanded. This has led to the suggestion that there is a certain degree of functional redundancy within the two branches, which eliminates the need to expand both subfamilies. The fact that plants have

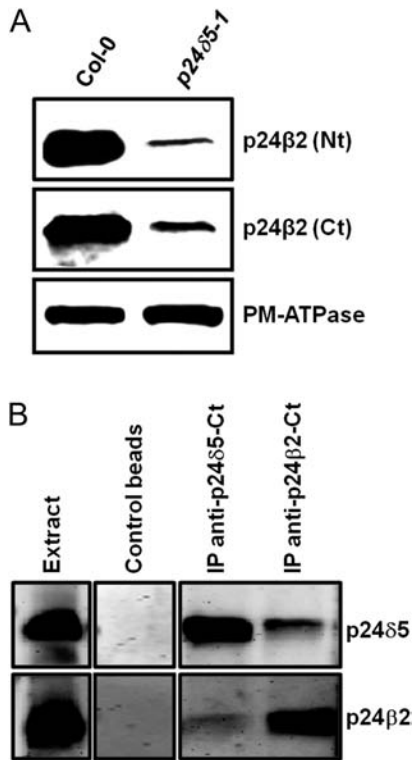


Fig. 10. Interaction between p24 proteins. (A) Western blot analysis showing the levels of p24 β 2 in membranes from the wild type (Col-0) or the p24 δ 5 knock-out mutant (*p24 δ 5-1*), using antibodies against the Nt or the Ct of p24 β 2. A 25 μ g aliquot of protein was loaded in each lane. Western blot with an antibody against the plasma membrane (PM) ATPase was used as a loading control. (B) Immunoprecipitation of p24 δ 5 and p24 β 2 using affinity-purified antibodies against the Ct of both proteins or control beads, followed by SDS-PAGE and western blot with antibodies against p24 δ 5 (Nt) or p24 β 2 (Ct). The extract lane contains 20 μ g of the membrane proteins used as input for the immunoprecipitation.

only members of one subfamily in each branch (p24 β and p24 δ) would be in support of this idea (Carney and Bowen, 2004; Strating and Martens, 2009; Strating *et al.*, 2009). In *Arabidopsis*, the delta subfamily contains nine different members (which herein have been named p24 δ 3–p24 δ 11), while the beta subfamily has only two members (here named p24 β 2 and p24 β 3). According to public microarray databases, five of them (p24 δ 4, p24 δ 5, p24 δ 9, p24 β 2, and p24 β 3) have high/medium levels of expression in different tissues. In contrast, other members of the delta subfamily have low and tissue-specific expression (Zimmermann *et al.*, 2004). It is thus possible that the first category includes members with a more general/housekeeping function, probably related to the maintenance of the secretory pathway, while the second category may include members with more tissue-specific functions. In this study, the focus was on the first category. To this end, p24 δ 5 was selected as a representative of the p24 δ subfamily and p24 β 2 as a representative of the p24 β subfamily (see Fig. 1A).

To gain some insight into the functions that p24 proteins may have in plants, T-DNA insertion mutants that were

available in the SALK collection for p24 δ 4 and p24 δ 5 (no T-DNA insertion knock-out mutants for p24 β 2 are available in mutant collections) were characterized and also a double mutant *p24 δ 4 δ 5* was generated. The lack of a distinct phenotype in the mutants suggests that p24 proteins of the delta subfamily play redundant functions and thus multiple mutants are being obtained. In any case, the available mutants were useful to characterize the specificity of antibodies and to investigate if the levels of p24 proteins in *Arabidopsis* were interdependent.

Localization of Arabidopsis p24 proteins

To localize endogenous p24 proteins, specific antibodies against p24 δ 5 and p24 β 2 were used. Immunogold labelling on sections from cryofixed samples showed that endogenous p24 δ 5 localized to ER membranes (as revealed with both Nt- and Ct-p24 δ 5 antibodies) as well as to the *cis* side of the Golgi complex (more evident with Ct-p24 δ 5 antibodies). This localization is consistent with the localization of mammalian p25 (p24 α), which is the only p24 family member which, in addition to *cis*-Golgi labelling also shows extensive ER localization (Wada *et al.*, 1991; Domínguez *et al.*, 1998; Lavoie *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000, 2003). It is important to emphasize that although p24 δ 5 belongs to the delta subfamily, its cytosolic tail is reminiscent of that of mammalian p25 (which belongs to the alpha subfamily). This cytosolic tail has been shown to bind COPI with high affinity via a dilysine motif at the -3,-4 position (relative to the cytosolic C-terminus) (Contreras *et al.*, 2004a) and is important for efficient Golgi to ER retrograde transport (Langhans *et al.*, 2008). In contrast to p24 δ 5, endogenous p24 β 2 localizes mainly to the Golgi apparatus. This localization is consistent with the localization of members of the p24 β subfamily, both in mammals (Domínguez *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 1999; Gommel *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000) and in yeast (Shimmöller *et al.*, 1995; Belden and Barlowe, 2001).

The localization of endogenous p24 proteins may depend, at least, on the sorting determinants present in the individual proteins as well as on the interactions with other p24 proteins. To investigate these two possibilities, RFP-p24 δ 5 and deletion mutants were transiently expressed, either individually or in combination with GFP-p24 β 2.

Sorting determinants in p24 δ 5

Tagging of p24 proteins with XFP between the signal sequence and the luminal domain produces constructs which faithfully reflect the trafficking dynamics and localization pattern of native p24 proteins (Blum *et al.*, 1999; Barr *et al.*, 2001; Majoul *et al.*, 2001; Gupta and Swarup, 2006; Simpson *et al.*, 2006; Blum and Lepier, 2008). Therefore, as in a previous investigation (Langhans *et al.*, 2008), the same strategy was used for all the constructs used in this study.

First, the relative contribution of the different domains of p24 proteins to their intracellular trafficking and localization

was investigated. For this project, p24 δ 5 was used as being representative of the family, since the sorting determinants in its cytosolic tail have previously been analysed. It was shown that the dilysine motif in the -3,-4 position was the main determinant for its ER localization. Here, the relative contributions of the luminal (GOLD and coiled-coil) domains were determined, using deletion mutants, in the presence or the absence of the dilysine motif in the -3,-4 position. The results show that neither the GOLD nor the coiled-coil domains are necessary for the ER localization of RFP-p24 δ 5 in the steady state or for the cycling of the protein in the early secretory pathway, at least when expressed individually. The fact that deletion mutants having only the transmembrane domain and the C-terminal tail localize correctly to the ER, unless the dilysine motif is mutated, strongly implicates the dilysine motif in the cytosolic tail as being the main determinant for the ER localization of RFP-p24 δ 5, presumably by facilitating its interaction with the COPI machinery. In clear contrast, the luminal domain (in particular the coiled-coil domain) seems to be necessary for transport of p24 dilysine mutants to the vacuole lumen. Since cargoes for plant p24 proteins have not yet been identified (as has been the case for many years for their mammalian and yeast counterparts), it cannot be ruled out that a fraction of p24 δ 5 (or other p24 proteins) could be involved in the transport of cargo destined for the PVC or the vacuole. Alternatively, transport to the vacuole may simply be a default pathway for membrane proteins in the secretory pathway (Langhans *et al.*, 2008).

The relative contribution of the different p24 δ 5 domains to trafficking of the p24 δ 5 protein shown here is consistent with results obtained using similar GFP constructs for p23 (p24 δ 1) in animal cells. Blum and Lepier (2008) showed that the minimal requirement for p23 cycling within the early secretory pathway was the transmembrane domain and the cytoplasmic tail with an intact KKLIE motif. The luminal domain was expendable for cycling between the ER and the Golgi apparatus, but was necessary for trafficking beyond the Golgi apparatus, in their case to the cell surface. In another study, however, the location of a p23/p24 dimer was shown to be independent of the KKLIE motif in p23 but instead required the coiled-coil domains in both proteins (Emery *et al.*, 2000). It has to be noted that, in contrast to p23 (p24 δ 1), p24 δ 5 has a p25 (p24 α)-like C-terminal tail, with high affinity for COPI (Contreras *et al.*, 2004a), which is responsible for its efficient Golgi to ER recycling (Langhans *et al.*, 2008). Therefore, it is likely that the sorting information contained in the cytosolic tail of RFP-p24 δ 5 is sufficient for its steady-state distribution in the ER. This scenario has also been proposed for mammalian p25, which normally resides in the ER, even when co-expressed with p23, p24, and p26 (Emery *et al.*, 2000).

Interactions between p24 proteins and coupled transport of p24 family members

Shuttling of p24 proteins in the ER-Golgi interface has been proposed to depend on interactions with other p24

family members (Dominguez *et al.*, 1998; Füllekrug *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000). Early experiments concluded that p24 proteins form heterotetrameric complexes via their coiled-coil domains with one member of each subfamily, both in animals (p23, p24, p25, and p27) (Fullerkrug *et al.*, 1999) and in yeast (Erv25p, Emp24p, Erp1p, and Erp2p) (Marzioch *et al.*, 1999). However, the pattern of interdependence between different p24 members seen in yeast raises the possibility that the postulated p24 tetramer is a double dimer (Ciuffo and Boyd, 2000). Moreover, the studies of Jenne *et al.* (2002) have shown that p24 proteins occur mostly as monomers and dimers of various compositions, depending on their subcellular location. In most cases, the best characterized dimers are the ones formed between one member of the p24 δ subfamily and one member of the p24 β subfamily. In yeast, Erv25 (p24 δ subfamily) and Emp24 (p24 β subfamily) have been shown to form a complex which is efficiently incorporated into ER-derived COPII vesicles and can exit the ER without the presence of Erp1 and Erp2, putative components of the yeast tetrameric p24 complex (Belden and Barlowe, 1996, 2001). In animals, a complex is formed between p23 (p24 δ subfamily) and p24 (p24 β subfamily) which can also exit the ER to be transported to the Golgi apparatus (Gommel *et al.*, 1999; Emery *et al.*, 2000). In both cases, retrograde transport of these complexes was postulated to depend on the dilysine motif present in the p24 δ members: Erv25 in yeast (Belden and Barlowe, 2001) and p23 in animals (Gommel *et al.*, 1999).

Several lines of evidence suggest that *Arabidopsis* p24 δ 5 and p24 β 2 interact with each other, and that this interaction is mediated by the coiled-coil domain. First, the protein levels of p24 β 2 seem to be dependent on p24 δ 5: a knock-out mutant lacking p24 δ 5 showed a drastic reduction in the levels of p24 β 2. This is consistent with previous reports in yeast and mammalian cells showing that depletion of one member of the p24 family affects the protein levels of other family members, suggesting interaction between those proteins (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch *et al.*, 1999; Denzel *et al.*, 2000; Vetrivel *et al.*, 2007; Takida *et al.*, 2008; Jerome-Majewska *et al.*, 2010; Koegler *et al.*, 2010; Zhang and Volchuk, 2010). Secondly, our co-immunoprecipitation data indicate that endogenous p24 δ 5 and p24 β 2 interact with each other: immunoprecipitation with p24 δ 5 antibodies is able to co-immunoprecipitate p24 β 2, and vice versa.

Transiently expressed proteins also seem to interact with each other. When expressed individually, GFP-p24 β 2 seems to be unstable, since the protein is hardly detectable either by confocal laser scanning microscopy or after western blot analysis. However, the levels of GFP-p24 β 2 increase enormously upon co-expression with RFP-p24 δ 5, an effect which is not seen when RFP-p24 δ 5 lacks the coiled-coil domain. This suggests that the interaction with p24 δ 5, via the coiled-coil domains, stabilizes p24 β 2. In contrast, transiently expressed RFP-p24 δ 5 seems to be stable in the absence of co-expressed GFP-p24 β 2, probably as a consequence of its predominant localization to the ER. In addition, the co-expression of GFP-p24 β 2 changes the pattern of

RFP-p24 δ 5 from its typical reticulate ER pattern to punctae where both proteins co-localize. This does not occur when p24 δ 5 lacks the coiled-coil domain.

Finally, the two proteins seem to travel together along the early secretory pathway. RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 may be efficiently incorporated into ERESs, as suggested by their significant co-localization with the COPII marker 6 kDa VP-CFP, for transport to the Golgi. When retrograde Golgi to ER transport is inhibited by expression of the ARF1(Q71L) mutant, GFP-p24 β 2 is transported downstream to the vacuole, where it appears to be degraded. In contrast, when RFP-p24 δ 5 is co-expressed with GFP-p24 β 2, the latter is not transported to the vacuole, but both proteins co-localize to punctate structures. This suggests that RFP-p24 δ 5 is able to hold GFP-p24 β 2 at the ER-Golgi interface, and possibly to mediate coupled trafficking of both proteins back to the ER. Therefore, it is possible that the steady-state localization found for endogenous proteins and their stability reflects the tight balance between the levels of these two proteins (or of other members of the family).

In summary, the results presented herein are consistent with a coupled trafficking of both proteins at the ER-Golgi interface. p24 δ 5 and p24 β 2 could interact with each other at ERESs for ER exit and coupled transport to the Golgi apparatus. Once in the Golgi, p24 δ 5 could interact very efficiently with the COPI machinery for retrograde transport back to the ER.

Addendum

While this manuscript was undergoing review, a paper was published showing trafficking and localization of p24 proteins in *Arabidopsis* (Chen *et al.*, 2012), which overlaps with some of the results presented herein. Using transient expression in tobacco leaf epidermal cells, these authors propose a subclass-specific localization for *Arabidopsis* p24 proteins: p24 δ 1a-d (p24 δ 3-6 in this study) are found to localize exclusively to the ER, p24 δ 2a-d (p24 δ 7-11 in this study) localize to ER and Golgi, and p24 β proteins localize exclusively to the Golgi apparatus. As representatives of each subclass for trafficking studies, they chose p24 δ 1d (p24 δ 6 in this study), p24 δ 2d (p24 δ 10 in this study), and p24 β 1 (p24 β 2 in this study). Surprisingly, these authors maintain that the steady-state localization of these proteins is not dependent on the position of the XFP tag. There are also significant discrepancies with the results presented here, which it is felt could be explained by this fact: p24 proteins have a very short cytosolic C-terminal tail, which contains the sorting signals for COPI/COPII binding. In the case of p24 δ proteins, these signals consist of a dilysine motif at the -3,-4 position and a diaromatic motif at the -7,-8 position. Indeed, it has been shown that the position of these signals (with respect to the C-terminus) is important for optimal binding of COP subunits (Teasdale and Jackson, 1996). Accordingly, it is difficult to imagine that the presence of an XFP molecule at the C-terminus has no influence in

trafficking and localization of the fusion proteins, even if they might be still partially functional. This is the reason why p24-XFP constructs used in mammalian research (Blum *et al.*, 1996; Majoul *et al.*, 2001; Simpson *et al.*, 2006; Blum and Lepier, 2008), as well as in a previous paper on plant p24 proteins (Langhans *et al.*, 2008) and in this study, have the XFP tag at the luminal N-terminus (immediately behind the signal sequence). The most striking differences between both studies can be summarized as follows. First, although transiently expressed RFP-p24 δ 5 localizes exclusively to the ER (as do all the members of the p24 δ 1 subfamily in the study by Chen *et al.*), endogenous p24 δ 5 (and possibly p24 δ 4) localizes to the ER but also to the *cis*-Golgi, suggesting that the steady-state localization of endogenous p24 proteins and their stability reflect the tight balance between the levels of the different members of the family. In this respect, the present study represents the first report on the localization of endogenous p24 proteins, through immunogold electron microscopy, in *Arabidopsis*.

Secondly, when RFP-p24 δ 1d (p24 δ 6 in this study) was co-expressed with p24 β 1-YFP (Ct-fusion) (p24 β 2 in this study), there was no change in the localization of RFP-p24 δ 1d. This is in marked contrast to the present co-expression data showing that GFP-p24 β 2 (Nt-fusion) changes the localization of RFP-p24 δ 5 (a close homologue of p24 δ 1d) and this requires the coiled-coil domain. Thirdly, Chen *et al.* showed that when p24 β 1-YFP (Ct-fusion) (p24 β 2 in this study) was co-expressed with the ARF1(Q71L) mutant, to interfere with Golgi to ER transport, the protein was still Golgi localized and only occasionally was found at the PVC (never at the vacuole). In the present study, when this protein was co-expressed with the ARF1 mutant, it was transported to the vacuole, unless it was co-expressed with RFP-p24 δ 5. This suggests that RFP-p24 δ 5 holds GFP-p24 β 2 at the ER-Golgi interface and may explain why transiently expressed GFP-p24 β 2 is not stable in the absence of RFP-p24 δ 5. Finally, the present study shows the first biochemical demonstration of interactions between *Arabidopsis* p24 proteins. In summary, while both studies are somehow complementary, there are a number of discrepancies which need to be resolved.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Figure S1. Nt- and Ct-sequences of *Arabidopsis* p24 proteins.

Figure S2. Characterization of T-DNA insertion mutants.

Figure S3. Localization of RFP-p24 δ 5 and deletion mutants and co-localization between GFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 5 or RFP-p24 δ 5(Δ CC) in *Arabidopsis* protoplasts.

Figure S4. RFP-p24 δ 5 and RFP-p24 δ 5 (Δ CC) localize to the ER at different expression levels.

Figure S5. Co-expression of RFP-p24 δ 5 and different DNA concentrations of GFP-p24 β 2.

Figure S6. Co-expression of RFP-p24 δ 5(Δ CC) and different DNA concentrations of GFP-p24 β 2.

Figure S7. A 2 h BFA treatment redistributes RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 to the ER.

Figure S8. A comparison between frame scan and line scan modes for co-localization studies.

Acknowledgements

The 6 kDa VP-CFP plasmid was kindly provided by Dr Aiming Wang (Southern Crop Protection and Food Research Centre, AAFC, Canada). We thank the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory for providing the sequence-indexed *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants, the greenhouse section of SCSIE (University of Valencia), and Pilar Selvi and Barbara Jesenofsky for excellent technical assistance.

This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación [grant number BFU2009-07039 to F.A.] and the Deutsche Forschungsgemeinschaft [grant number RO 440/14-1 to D.G.R.]. J.C.M. was a recipient of fellowships from Generalitat Valenciana (Geronimo Forteza Program) and from the Ministerio de Educación y Ciencia (FPU Program).

References

- Anantharaman V, Aravind L.** 2002. The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biology* **3**, research0023.
- Aniento F, Matsuoka K, Robinson DG.** 2006. ER-to-Golgi transport: the COPII-pathway. In: Robinson DG, ed. *The plant endoplasmic reticulum*. Berlin: Springer-Verlag, 99–124.
- Axelos M, Curie C, Bardet C, Lescure B.** 1992. A protocol for transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* **30**, 123–128.
- Barr FA, Preisinger C, Kopajtic R, Körner R.** 2001. Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus. *Journal of Cell Biology* **155**, 885–891.
- Belden WJ, Barlowe C.** 1996. Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 26939–26946.
- Belden WJ, Barlowe C.** 2001. Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 43040–43048.
- Blum R, Feick P, Puype M, Vandekerckhove J, Klengel R, Nastainczyk W, Schulz I.** 1996. Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 17183–17189.
- Blum R, Lepier A.** 2008. The luminal domain of p23 (Tmp21) plays a critical role in p23 cell surface trafficking. *Traffic* **9**, 1530–1550.
- Blum R, Pfeiffer F, Feick P, Nastainczyk W, Kohler B, Schafer KH, Schulz I.** 1999. Intracellular localization and *in vivo* trafficking of p24A and p23. *Journal of Cell Science* **112**, 537–548.
- Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus JM, Paris N.** 2002. The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *The Plant Cell* **14**, 1077–1092.
- Bubeck J, Scheuring D, Hummel E, Langhans M, Viotti C, Foresti O, Denecke J, Banfield DK, Robinson DG.** 2008. The syntaxins SYP31 and SYP81 control ER–Golgi trafficking in the plant secretory pathway. *Traffic* **9**, 1629–1652.
- Buechling T, Chaudhary V, Spirohn K, Weiss M, Boutros M.** 2011. p24 proteins are required for secretion of Wnt ligands. *EMBO Reports* **12**, 1265–1272.
- Carney GE, Bowen NJ.** 2004. p24 proteins, intracellular trafficking, and behaviour: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biology of the Cell* **96**, 271–278.
- Castillon GA, Aguilera-Romero A, Manzano-Lopez J, Epstein S, Kajiwara K, Funato K, Watanabe R, Riezman H, Muñoz M.** 2011. The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 2924–2936.
- Chen F, Hasegawa H, Schmitt-Ulms G, et al.** 2006. TMP21 is a presenilin complex component that modulates γ -secretase but not ϵ -secretase activity. *Nature* **440**, 1208–1212.
- Chen J, Qi X, Zheng H.** 2012. Subclass-specific localization and trafficking of Arabidopsis p24 proteins in the ER–Golgi interface. *Traffic* **13**, 400–415.
- Ciufo LF, Boyd A.** 2000. Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 8382–8388.
- Contreras I, Ortiz-Zapater E, Aniento F.** 2004a. Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant ARF1 and coatomer. *The Plant Journal* **38**, 685–698.
- Contreras I, Yang Y, Robinson DG, Aniento F.** 2004b. Plant COPI and COPII coat proteins show a differential affinity for p24 cytosolic tails. *Plant Cell Physiology* **45**, 1779–1786.
- Cosson P, Letourneur F.** 1994. Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* **263**, 1629–1631.
- DaSilva LL, Foresti O, Denecke J.** 2006. Targeting of the plant vacuolar sorting receptor BP80 is dependent on multiple sorting signals in the cytosolic tail. *The Plant Cell* **18**, 1477–1497.
- DaSilva LL, Taylor JP, Hadlington JL, Hanton SL, Snowden CJ, Fox SJ, Foresti O, Brandizzi F, Denecke J.** 2005. Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *The Plant Cell* **17**, 132–148.
- Denzel A, Otto F, Girod A, Pepperkok R, Watson R, Rosewell I, Bergeron JJ, Solari RC, Owen MJ.** 2000. The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Current Biology* **10**, 55–58.
- Dominguez M, Dejgaard K, Fullekrug J, Dahan S, Fazel A, Paccaud JP, Thomas DY, Bergeron JJ, Nilsson T.** 1998. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network

- bind both COPI and COPII coatomer. *Journal of Cell Biology* **140**, 751–765.
- Emery G, Parton RG, Rojo M, Gruenberg J.** 2003. The transmembrane protein p25 forms highly specialized domains that regulate membrane composition and dynamics. *Journal of Cell Science* **116**, 4821–4832.
- Emery G, Rojo M, Gruenberg J.** 2000. Coupled transport of p24 family members. *Journal of Cell Science* **113**, 2507–2516.
- Fiedler K, Veit M, Stamnes MA, Rothman JE.** 1996. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**, 1396–1399.
- Fujita M, Watanabe R, Jaensch N, Romanova-Michaelides M, Satoh T, Kato M, Riezman H, Yamaguchi Y, Maeda Y, Kinoshita T.** 2011. Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI. *Journal of Cell Biology* **194**, 61–75.
- Füllerkrug J, Sukanuma T, Tang BL, Hong W, Storrer B, Nilsson T.** 1999. Localization and recycling of gp27 (hp24g3): complex formation with other p24 family members. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1939–1955.
- Gommel D, Orci L, Emig EM, Hannah MJ, Ravazzola M, Nickel W, Helms JB, Wieland FT, Sohn K.** 1999. p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between organelles of the early secretory pathway. *FEBS Letters* **447**, 179–185.
- Gupta V, Swarup G.** 2006. Evidence for a role of transmembrane protein p25 in localization of protein tyrosine phosphatase TC48 to the ER. *Journal of Cell Science* **119**, 1703–1714.
- Hasegawa H, Liu L, Nishimura M.** 2010. Dilysine retrieval signal-containing p24 proteins collaborate in inhibiting γ -cleavage of amyloid precursor protein. *Journal of Neurochemistry* **115**, 771–781.
- Jenne N, Frey K, Brügger B, Wieland FT.** 2002. Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 46504–46511.
- Jerome-Majewska LA, Achkar T, Luo L, Lupu F, Lacy E.** 2010. The trafficking protein Tmed2/p24beta(1) is required for morphogenesis of the mouse embryo and placenta. *Developmental Biology* **341**, 154–166.
- Koegler E, Bonnon C, Waldmeier L, Mitrovic S, Halbeisen R, Hauri HP.** 2010. p28, a novel ERGIC/cis Golgi protein, required for Golgi ribbon formation. *Traffic* **11**, 70–89.
- Langhans M, Förster S, Helmchen G, Robinson DG.** 2011. Differential effects of the brefeldin A analogue (6R)-hydroxy-BFA in tobacco and Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2949–2957.
- Langhans M, Marcote MJ, Pimpl P, Virgili-López G, Robinson DG, Aniento F.** 2008. *In vivo* trafficking and localization of p24 proteins in plant cells. *Traffic* **9**, 770–785.
- Lavoie C, Paiement J, Dominguez M, Roy L, Dahan S, Gushue JN, Bergeron JJ.** 1999. Roles for alpha(2)p24 and COPI in endoplasmic reticulum cargo exit site formation. *Journal of Cell Biology* **146**, 285–300.
- Lerich A, Langhans M, Sturm S, Robinson DG.** 2011. Is the 6kDa tobacco etch viral protein a bona fide ERES marker? *Journal of Experimental Botany* **62**, 5013–5023.
- Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Demolliere C, Duden R, Emr SD, Riezman H, Cosson P.** 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199–1207.
- Luo W, Wang Y, Reiser G.** 2011. Proteinase-activated receptors, nucleotide P2Y receptors, and μ -opioid receptor-1B are under the control of the type I transmembrane proteins p23 and p24A in post-Golgi trafficking. *Journal of Neurochemistry* **117**, 71–81.
- Luo W, Wang Y, Reiser G.** 2007. p24A, a type I transmembrane protein, controls ARF1-dependent resensitization of protease-activated receptor-2 by influence on receptor trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 30246–30255.
- Majoul I, Straub M, Hell SW, Duden R, Söling HD.** 2001. KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Developmental Cell* **1**, 139–153.
- Marzioch M, Henthorn DC, Herrmann JM, Wilson R, Thomas DY, Bergeron JJ, Solari RC, Rowley A.** 1999. Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1923–1938.
- Mitrovic S, Ben-Tekaya H, Koegler E, Gruenberg J, Hauri HP.** 2008. The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 1976–1990.
- Muñiz M, Morsomme P, Riezman H.** 2001. Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell* **104**, 313–320.
- Muñiz M, Nuoffer C, Hauri HP, Riezman H.** 2000. The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *Journal of Cell Biology* **148**, 925–930.
- Nebenführ A, Frohlick JA, Staehelin LA.** 2000. Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiology* **124**, 135–151.
- Nebenführ A, Gallagher LA, Dunahay TG, Frohlick JA, Mazurkiewicz AM, Meehl JB, Staehelin LA.** 1999. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiology* **121**, 1127–1142.
- Nickel W, Sohn K, Bunning C, Wieland F.** 1997. p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**, 11393–11398.
- Ortiz-Masia D, Perez-Amador MA, Carbonell J, Marcote MJ.** 2007. Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of Arabidopsis. *FEBS Letters* **581**, 1834–1840.
- Ortiz-Zapater E, Soriano-Ortega E, Marcote MJ, Ortiz-Masiá D, Aniento F.** 2006. Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. *The Plant Journal* **48**, 757–770.
- Pimpl P, Denecke J.** 2002. Protein–protein interactions in the secretory pathway, a growing demand for experimental approaches *in vivo*. *Plant Molecular Biology* **50**, 887–902.

- Pimpl P, Hanton SL, Taylor JP, Pinto-DaSilva LL, Denecke J.** 2003. The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *The Plant Cell* **15**, 1242–1256.
- Pimpl P, Taylor JP, Snowden C, Hillmer S, Robinson DG, Denecke J.** 2006. Golgi-mediated vacuolar sorting of the endoplasmic reticulum chaperone BiP may play an active role in quality control within the secretory pathway. *The Plant Cell* **18**, 198–211.
- Port F, Hausmann G, Basler K.** 2011. A genome-wide RNA interference screen uncovers two p24 proteins as regulators of Wingless secretion. *EMBO Reports* **12**, 1144–1152.
- Ribeiro D, Foresti O, Denecke J, Wellink J, Goldbach R, Kormelink RJ.** 2008. Tomato spotted wilt virus glycoproteins induce the formation of endoplasmic reticulum- and Golgi-derived pleomorphic membrane structures in plant cells. *Journal of General Virology* **89**, 1811–1818.
- Rojo M, Emery G, Marjomäki V, McDowall A, Parton RG, Gruenberg J.** 2000. The transmembrane protein p23 contributes to the organization of the Golgi apparatus. *Journal of Cell Science* **113**, 1043–1057.
- Rojo M, Peperkok R, Emery G, Kellner R, Stang E, Parton RG, Gruenberg J.** 1997. Involvement of the transmembrane protein p23 in biosynthetic protein transport. *Journal of Cell Biology* **139**, 1119–1135.
- Schimmöller F, Singer-Krüger B, Schröder S, Krüger U, Barlowe C, Riezman H.** 1995. The absence of Em24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO Journal* **14**, 1329–1339.
- Simpson JC, Nilsson T, Peperkok R.** 2006. Biogenesis of tubular ER-to-Golgi transport intermediates. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 723–737.
- Sohn K, Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Brunner M, Kahn RA, Rothman JE.** 1996. A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatamer binding. *Journal of Cell Biology* **135**, 1239–1248.
- Stamnes MA, Craighead MW, Hoe MH, Lampen N, Geromanos S, Tempst P, Rothman JE.** 1995. An integral membrane component of coatamer-coated transport vesicles defines a family of proteins involved in budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **92**, 8011–8015.
- Strating JR, Martens GJ.** 2009. The p24 family and selective transport processes at the ER–Golgi interface. *Biology of the Cell* **101**, 495–509.
- Strating JR, van Bakel NH, Leunissen JA, Martens GJ.** 2009. A comprehensive overview of the vertebrate p24 family: identification of a novel tissue-specifically expressed member. *Molecular Biology of Evolution* **26**, 1707–1714.
- Takida S, Maeda Y, Kinoshita T.** 2008. Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane. *Biochemical Journal* **409**, 555–562.
- Teasdale RD, Jackson MR.** 1996. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **12**, 27–54.
- Ueda T, Uemura T, Sato MH, Nakano A.** 2004. Functional differentiation of endosomes in Arabidopsis cells. *The Plant Journal* **40**, 783–789.
- Vetrivel KS, Gong P, Bowen JW, et al.** 2007. Dual roles of the transmembrane protein p23/TMP21 in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *Molecular Neurodegeneration* **2**, 4.
- Wada I, Rindress D, Cameron PH, Ou WJ, Doherty JJ 2nd, Louvard D, Bell AW, Dignard D, Thomas DY, Bergeron JJ.** 1991. SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 19599–19610.
- Wen C, Greenwald I.** 1999. p24 proteins and quality control of LIN-12 and GLP-1 trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology* **145**, 1165–1175.
- Zhang L, Volchuk A.** 2010. p24 family type 1 transmembrane proteins are required for insulin biosynthesis and secretion in pancreatic beta-cells. *FEBS Letters* **584**, 2298–2304.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W.** 2004. GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**, 2621–2632.

COUPLED TRANSPORT OF ARABIDOPSIS p24 PROTEINS AT THE ER-GOLGI INTERFACE

Juan Carlos Montesinos*¹, Silke Sturm*², Markus Langhans², Stefan Hillmer², María Jesús Marcote¹, David G. Robinson² and Fernando Aniento^{1,#}

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Nt- and Ct-sequences of Arabidopsis p24 proteins.

Sequence of the N-terminus and the C-terminus of the 11 members of the p24 family in Arabidopsis, including those from the delta subfamily (p24 δ 3-p24 δ 11) and those from the beta subfamily (p24 β 2-p24 β 3). Sequences used to obtain peptide antibodies are underlined.

Figure S2. Characterization of T-DNA insertion mutants.

A. RT-PCR analysis of *p24 δ 5-1*, *p24 δ 4-1* mutants to show the absence of *p24 δ 5* and *p24 δ 4* mRNA, respectively. Total RNA from leaves of the T-DNA insertion mutant and wild-type plants were used for the RT-PCR. In the PCRs, gene specific primers were used. *Actin7* (*ACT7*) was used as a control. B. *p24 δ 5-1*, *p24 δ 4-1* and *p24 δ 4 δ 5* mutant seedlings grown on vertical agar plates for 6 days did not show a phenotype different from that of wild-type (Col-0)

plants. C. Three-week-old *p24 δ 5-1*, *p24 δ 4-1* and *p24 δ 4 δ 5* mutant plants did not show a phenotype different from that of wild-type (Col-0) plants.

Figure S3. Localization of RFP-p24 δ 5 and deletion mutants and colocalization between GFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 5 or RFP-p24 δ 5(Δ CC) in *Arabidopsis* protoplasts.

A-L. Transient gene expression in *Arabidopsis* protoplasts. A-C. RFP-p24 δ 5 (A) shows a typical ER pattern and colocalizes with the ER marker GFP-HDEL (B) (merged image in C). D-F. RFP-p24 δ 5 deletion mutants lacking the coiled-coil domain (Δ CC) (D), the GOLD domain (Δ GOLD) (E) or both (TMCT) (F) show a typical ER pattern and colocalize with the ER marker GFP-HDEL. G-I. GFP-p24 β 2 (G) and RFP-p24 δ 5 (H) colocalize in punctate structures (see merged images in I). J-L. GFP-p24 β 2 (J) and RFP-p24 δ 5 (Δ CC) (K) do not colocalize (see merged image in L). Scale bars = 5 μ m.

Figure S4. RFP-p24 δ 5 and RFP-p24 δ 5 (Δ CC) localize to the ER at different expression levels.

A-P. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts using the indicated concentrations of DNA (from 0.3 to 10 μ g). A-H. RFP-p24 δ 5 shows a typical ER pattern at all DNA concentrations and both at 5 (A-D) or 24 (E-H) hours post-electroporation. I-P. RFP-p24 δ 5(Δ CC) shows a typical ER pattern at all DNA concentrations and both at 5 (I-L) or 24 (M-P) hours post-electroporation. Scale bars = 5 μ m.

Figure S5. Co-expression of RFP-p24 δ 5 and different DNA concentrations of GFP-p24 β 2.

A-I. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. An increased ratio in the concentrations of GFP-p24 β 2 (A, 5 μ g; D, 25 μ g; G, 50 μ g) vs RFP-p24 δ 5 (35 μ g, B, E and H) induces a progressive change in the localization of RFP-p24 δ 5, from a mainly reticulate pattern (B) to a mostly punctate one (H), and increased colocalization between both proteins (merged images in C, F and I). Scale bars = 5 μ m.

Figure S6. Co-expression of RFP-p24 δ 5(Δ CC) and different DNA concentrations of GFP-p24 β 2.

A-I. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. An increased ratio in the concentrations of GFP-p24 β 2 (A, 5 μ g; D, 25 μ g; G, 50 μ g) vs RFP-p24 δ 5 (Δ CC) (35 μ g, B, E and H) does not change the reticulate pattern of RFP-p24 δ 5 (merged images in C, F and I). Scale bars = 5 μ m.

Figure S7. 2 h BFA treatment redistributes RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 to the ER.

A-C. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. Treatment with BFA (90 μ M, 120 min) after coexpression of GFP-p24 β 2 (A) and RFP-p24 δ 5 (B) may induce a complete relocalization of both proteins to the ER (merged image in C). Scale bars = 5 μ m.

Figure S8. A comparison between frame scan and line scan modes for colocalization studies. A-L. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. A-F. GFP-p24 β 2 (A, D) colocalizes partially with the Golgi marker Man1-RFP (B, E) in punctate structures (merged images in C and F), both in the frame scan mode (A-C) and in the line scan mode (D-F). G-L. GFP-p24 β 2 (G, J) punctae do not colocalize with the PVC marker ARA6-RFP (H, K) (merged images in I and L), neither in the frame scan mode (G-I) nor in the line scan mode (J-L).

Figure S1

	<u>N-terminus</u>	<u>C-terminus</u>
p24 δ 3	VWLDVPPTGT	YLKQYFEKKKLI
p24 δ 4	VWLTVPHTGS	YLKQYFEKKKLI
p24 δ 5	<u>IWLTIPTTGG</u>	<u>YLKRYFHKKKLI</u>
p24 δ 6	IWLTVPESGE	YLKRYFLKKKLI
p24 δ 7	IRYELLSGHT	HLKTFFQKKKLI
p24 δ 8	MRYELKSSKT	HLKTFFEKKKLI
p24 δ 9	LHFELQSGRT	HLKTFFEKKKVI
p24 δ 10	LHFDLHSGRT	HLKTFFEKKKVI
p24 δ 11	MRLDMESGNT	HLKSFLERKKLL
p24 β 2	<u>IRFVIDREE</u>	<u>LFERKLGMSRV</u>
p24 β 3	<u>LSVTVNDEE</u>	<u>LFSKSVAYNRV</u>

Figure S1. Nt- and Ct-sequences of Arabidopsis p24 proteins.

Sequence of the N-terminus and the C-terminus of the 11 members of the p24 family in Arabidopsis, including those from the delta subfamily (p24 δ 3-p24 δ 11) and those from the beta subfamily (p24 β 2-p24 β 3). Sequences used to obtain peptide antibodies are underlined.

Figure S2

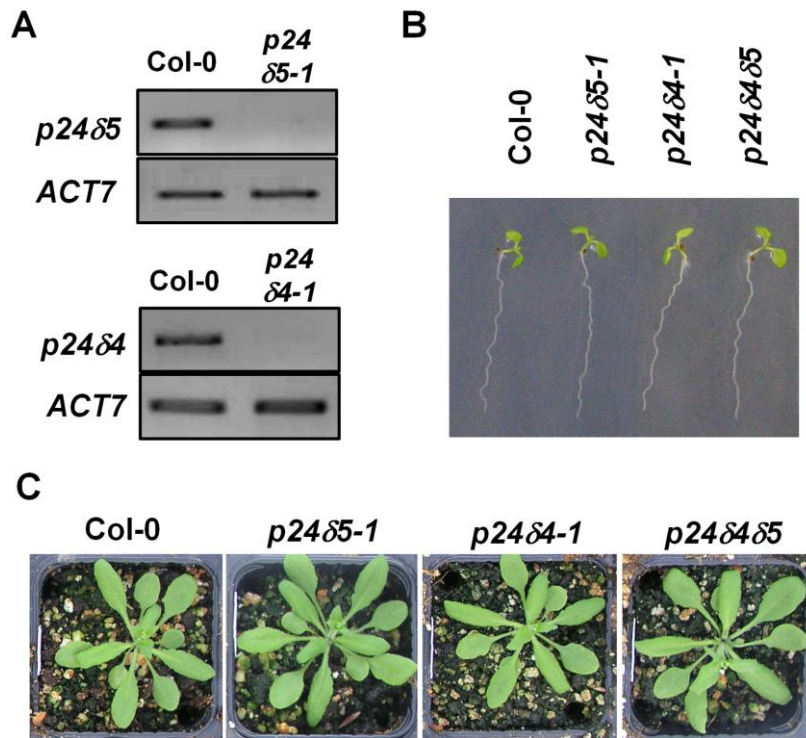


Figure S2. Characterization of T-DNA insertion mutants.

A. RT-PCR analysis of *p24δ5-1*, *p24δ4-1* mutants to show the absence of *p24δ5* and *p24δ4* mRNA, respectively. Total RNA from leaves of the T-DNA insertion mutant and wild-type plants were used for the RT-PCR. In the PCRs, gene specific primers were used. *Actin7* (*ACT7*) was used as a control. B. *p24δ5-1*, *p24δ4-1* and *p24δ4δ5* mutant seedlings grown on vertical agar plates for 6 days did not show a phenotype different from that of wild-type (Col-0) plants. C. Three-week-old *p24δ5-1*, *p24δ4-1* and *p24δ4δ5* mutant plants did not show a phenotype different from that of wild-type (Col-0) plants.

Figure S3

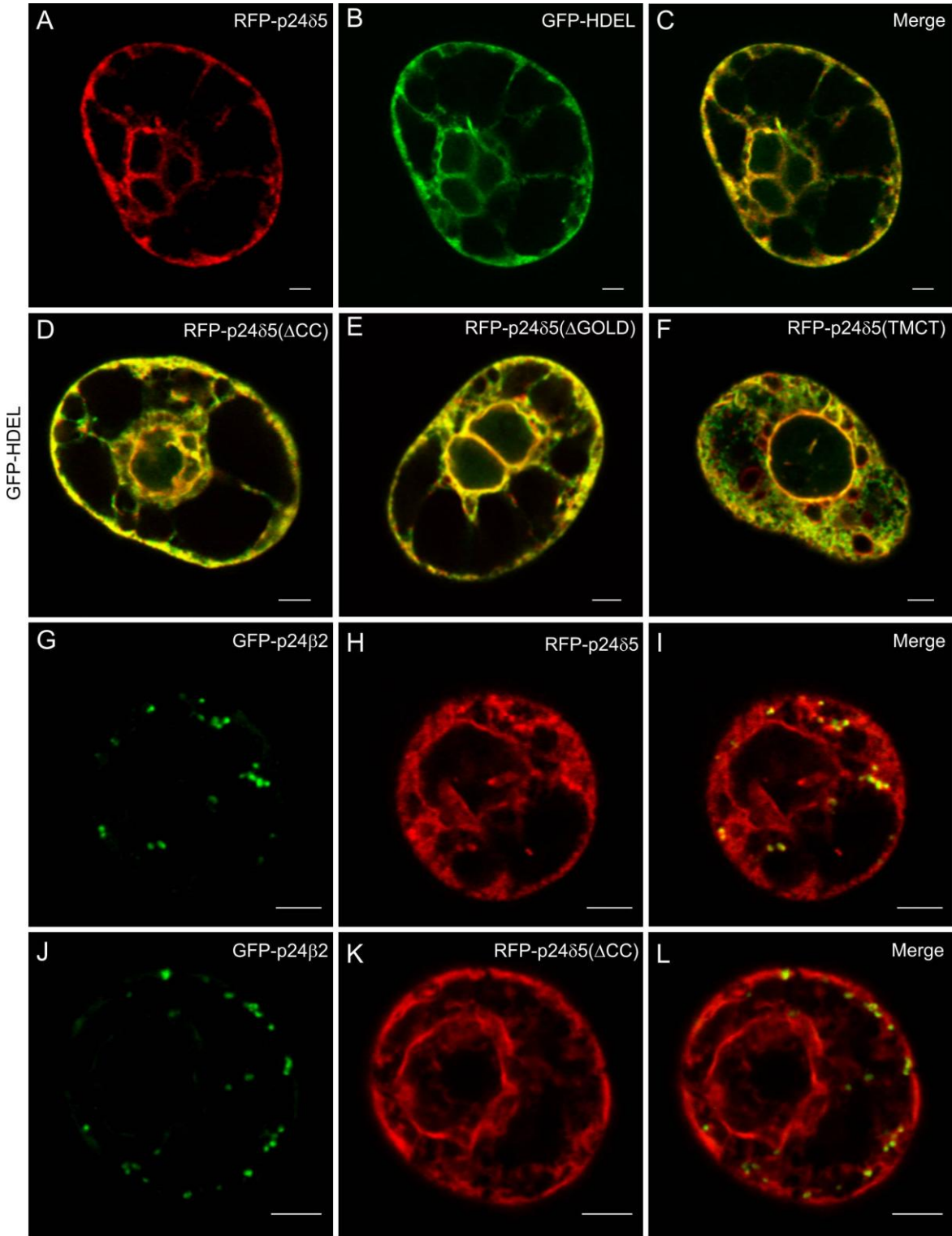


Figure S3. Localization of RFP-p24 δ 5 and deletion mutants and colocalization between GFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 5 or RFP-p24 δ 5(Δ CC) in *Arabidopsis* protoplasts.

A-L. Transient gene expression in *Arabidopsis* protoplasts. A-C. RFP-p24 δ 5 (A) shows a typical ER pattern and colocalizes with the ER marker GFP-HDEL (B) (merged image in C). D-F. RFP-p24 δ 5 deletion mutants lacking the coiled-coil domain (Δ CC) (D), the GOLD domain (Δ GOLD) (E) or both (TMCT) (F) show a typical ER pattern and colocalize with the ER marker GFP-HDEL. G-I. GFP-p24 β 2 (G) and RFP-p24 δ 5 (H) colocalize in punctate structures (see merged images in I). J-L. GFP-p24 β 2 (J) and RFP-p24 δ 5 (Δ CC) (K) do not colocalize (see merged image in L). Scale bars = 5 μ m.

Figure S4

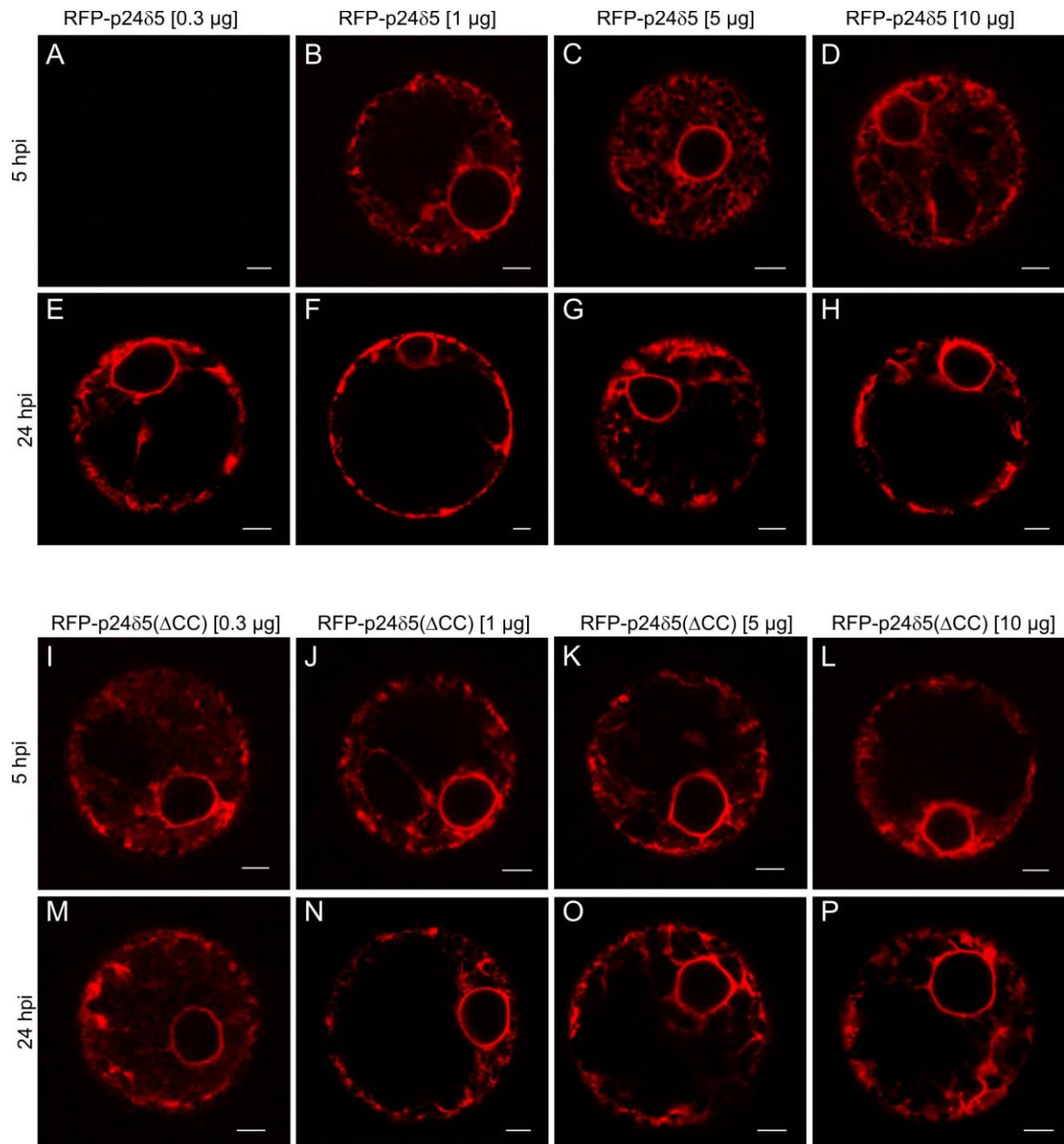


Figure S4. RFP-p24 δ 5 and RFP-p24 δ 5 (Δ CC) localize to the ER at different expression levels.

A-P. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts using the indicated concentrations of DNA (from 0.3 to 10 μ g). A-H. RFP-p24 δ 5 shows a typical ER pattern at all DNA concentrations and both at 5 (A-D) or 24 (E-H) hours post-electroporation. I-P. RFP-p24 δ 5(Δ CC) shows a typical ER pattern at all DNA concentrations and both at 5 (I-L) or 24 (M-P) hours post-electroporation. Scale bars = 5 μ m.

Figure S5

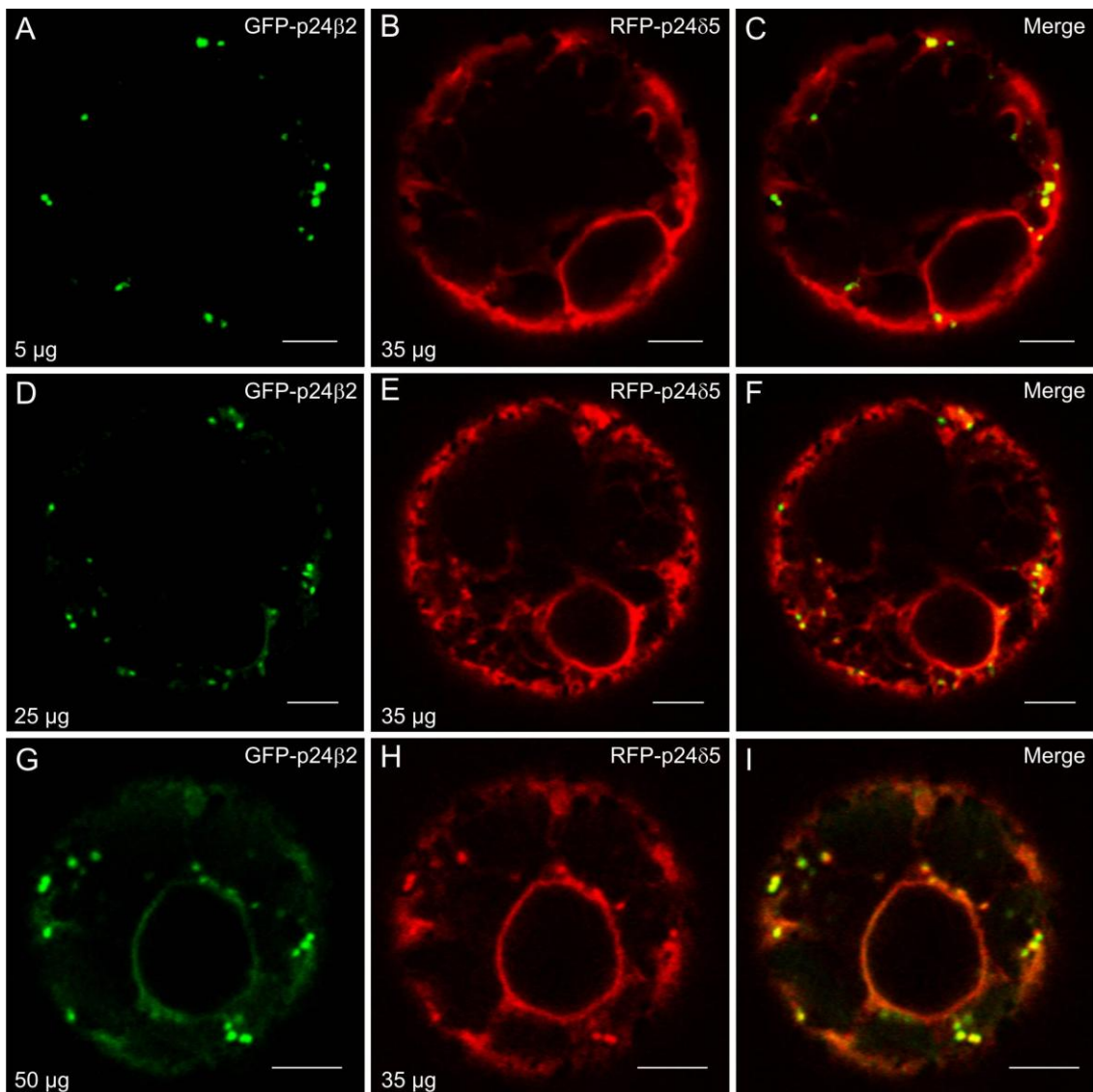


Figure S5. Co-expression of RFP-p24 δ 5 and different DNA concentrations of GFP-p24 β 2.

A-I. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. An increased ratio in the concentrations of GFP-p24 β 2 (A, 5 μ g; D, 25 μ g; G, 50 μ g) vs RFP-p24 δ 5 (35 μ g, B, E and H) induces a progressive change in the localization of RFP-p24 δ 5, from a mainly reticulate pattern (B) to a mostly punctate one (H), and increased colocalization between both proteins (merged images in C, F and I). Scale bars = 5 μ m.

Figure S6

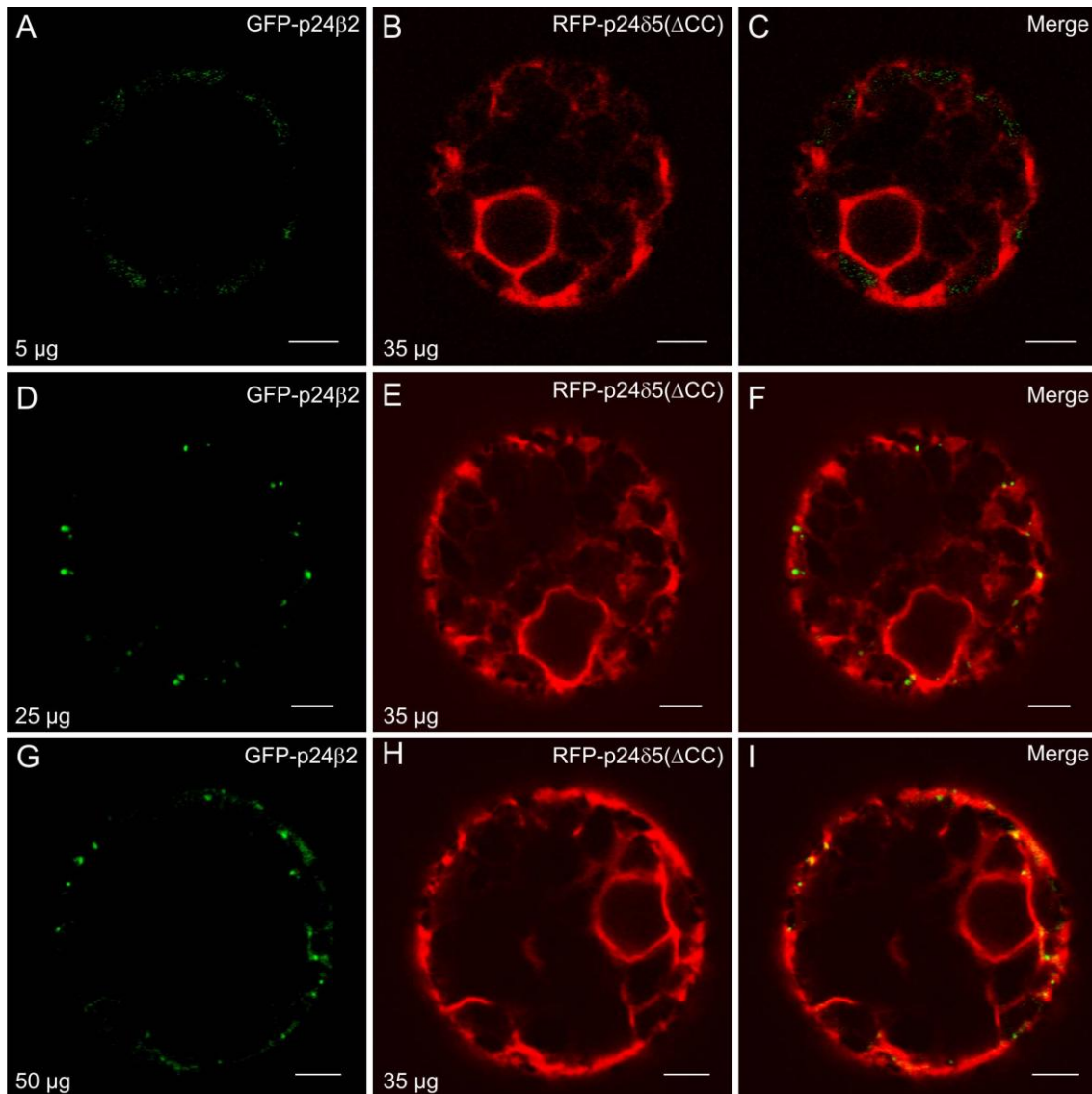


Figure S6. Co-expression of RFP-p24 δ 5(Δ CC) and different DNA concentrations of GFP-p24 β 2.

A-I. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. An increased ratio in the concentrations of GFP-p24 β 2 (A, 5 μ g; D, 25 μ g; G, 50 μ g) vs RFP-p24 δ 5 (Δ CC) (35 μ g, B, E and H) does not change the reticulate pattern of RFP-p24 δ 5 (merged images in C, F and I). Scale bars = 5 μ m.

Figure S7

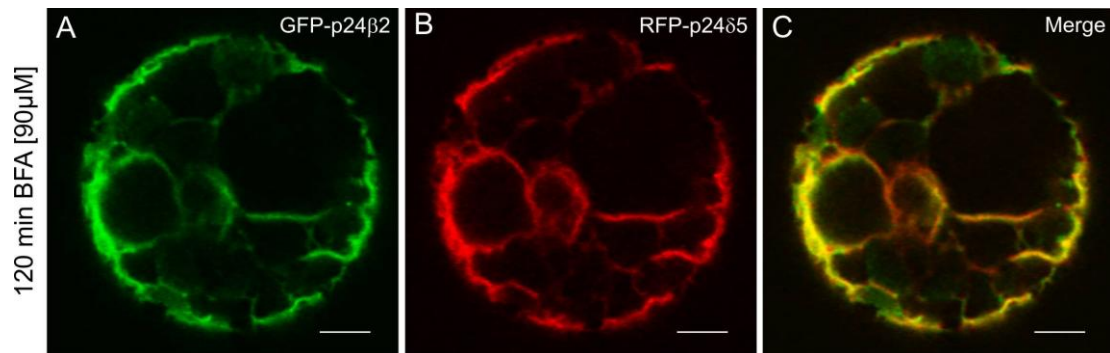


Figure S7. 2 h BFA treatment redistributes RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 to the ER.

A-C. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. Treatment with BFA (90 μ M, 120 min) after coexpression of GFP-p24 β 2 (A) and RFP-p24 δ 5 (B) may induce a complete relocalization of both proteins to the ER (merged image in C). Scale bars = 5 μ m.

Figure S8

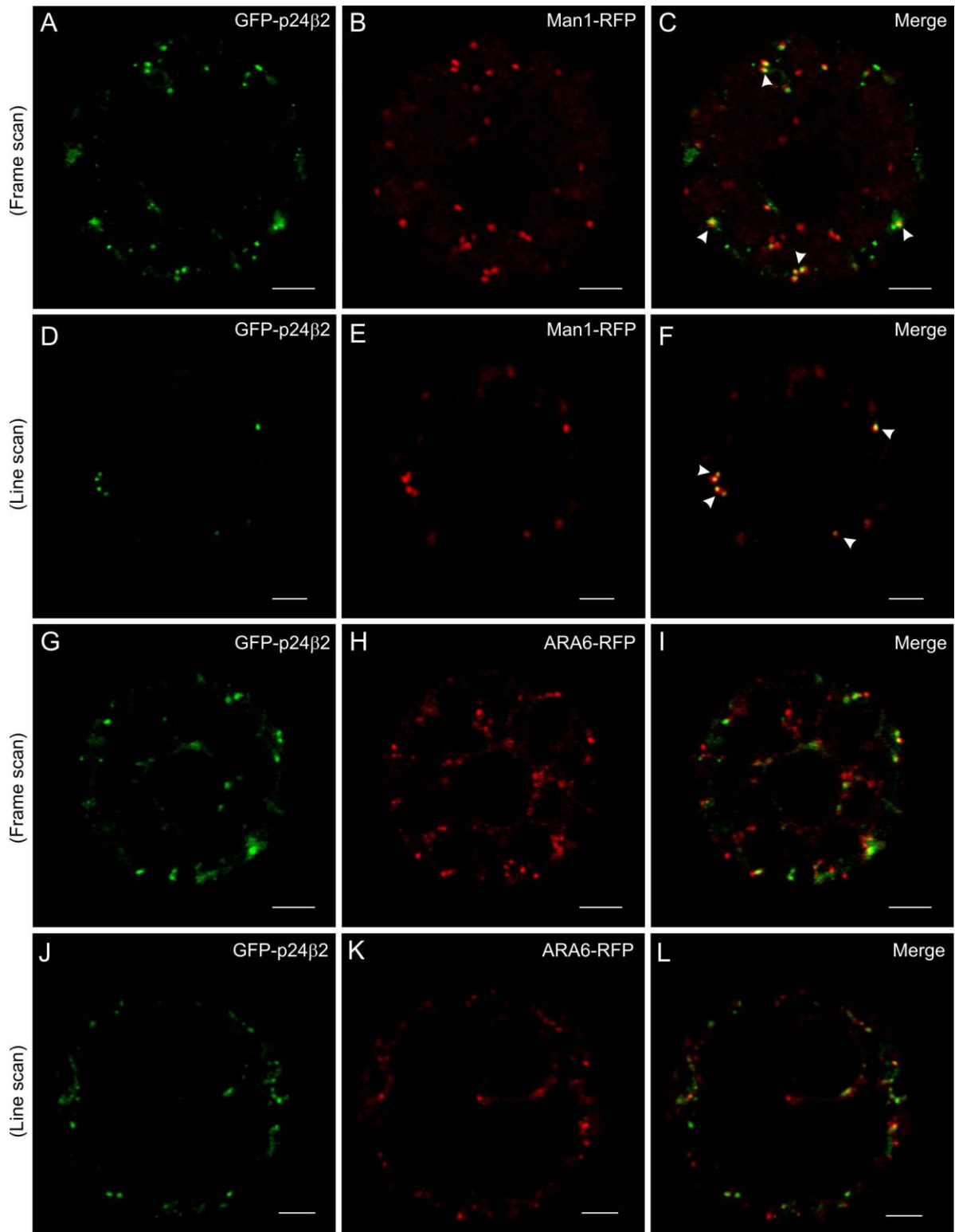


Figure S8. A comparison between frame scan and line scan modes for colocalization studies. A-L. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. A-F. GFP-p24 β 2 (A, D) colocalizes partially with the Golgi marker Man1-RFP (B, E) in punctate structures (merged images in C and F), both in the frame scan mode (A-C) and in the line scan mode (D-F). G-L. GFP-p24 β 2 (G, J) punctae do not colocalize with the PVC marker ARA6-RFP (H, K) (merged images in I and L), neither in the frame scan mode (G-I) nor in the line scan mode (J-L).

ARTÍCULO 2

Putative p24 complexes in *Arabidopsis* contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway

Juan Carlos Montesinos, Markus Langhans, Silke Sturm, Stefan Hillmer, Fernando Aniento, David G. Robinson and María Jesús Marcote

Journal of Experimental Botany, Vol. 64, No. 11, pp. 3147–3167, 2013

doi:10.1093/jxb/ert157

RESEARCH PAPER

Putative p24 complexes in *Arabidopsis* contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway

Juan Carlos Montesinos^{1,*}, Markus Langhans^{2,*}, Silke Sturm^{2,*}, Stefan Hillmer², Fernando Aniento¹, David G. Robinson² and María Jesús Marcote^{1,†}

¹ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia, Spain

² Department of Plant Cell Biology, Centre for Organismal Studies, University of Heidelberg, Germany

*These authors contributed equally to this work.

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: mariajesus.marcote@uv.es

Received 5 April 2013; Revised 5 April 2013; Accepted 29 April 2013

Abstract

p24 proteins are a family of type I membrane proteins localized to compartments of the early secretory pathway and to coat protein I (COPI)- and COPII-coated vesicles. They can be classified, by sequence homology, into four subfamilies, named p24 α , p24 β , p24 γ , and p24 δ . In contrast to animals and fungi, plants contain only members of the p24 β and p24 δ subfamilies, the latter probably including two different subclasses. It has previously been shown that transiently expressed red fluorescent protein (RFP)-p24 δ 5 (p24 δ 1 subclass) localizes to the endoplasmic reticulum (ER) at steady state as a consequence of highly efficient COPI-based recycling from the Golgi apparatus. It is now shown that transiently expressed RFP-p24 δ 9 (p24 δ 2 subclass) also localizes to the ER. In contrast, transiently expressed green fluorescent protein (GFP)-p24 β 3 mainly localizes to the Golgi apparatus (as p24 β 2) and exits the ER in a COPII-dependent manner. Immunogold electron microscopy in *Arabidopsis* root tip cells using specific antibodies shows that endogenous p24 δ 9 localizes mainly to the ER but also partially to the *cis*-Golgi. In contrast, endogenous p24 β 3 mainly localizes to the Golgi apparatus. By a combination of experiments using transient expression, knock-out mutants, and co-immunoprecipitation, it is proposed that *Arabidopsis* p24 proteins form different heteromeric complexes (including members of the β and δ subfamilies) which are important for their stability and their coupled trafficking at the ER–Golgi interface. Evidence is also provided for a role for p24 δ 5 in retrograde Golgi–ER transport of the KDEL-receptor ERD2.

Key words: *Arabidopsis*, coat protein I (COPI), coat protein II (COPII), ER–Golgi transport, p24 proteins, secretory pathway.

Introduction

p24 proteins constitute a family of small (20–25 kDa) type I membrane proteins which localize to compartments of the early secretory pathway and to coat protein I (COPI)- and COPII-coated vesicles (for reviews, see [Strating and Martens, 2009](#); [Dancourt and Barlowe, 2010](#)). All p24 proteins consist of a large luminal portion, which includes the GOLD (GOLgi Dynamics) and coiled-coil domains, a single transmembrane domain, and a short cytoplasmic C-terminus which contains motifs for COPI and COPII binding ([Supplementary](#)

[Fig. S1](#) available at *JXB* online). Whereas the transmembrane domain seems to recognize a single sphingolipid species ([Contreras *et al.*, 2012](#)), the luminal GOLD domain is predicted to be involved in specific protein–protein interactions and has been postulated to interact with putative cargo proteins ([Anantharaman and Aravind, 2002](#); [Carney and Bowen, 2004](#)). The coiled-coil domain of p24 proteins enables intermolecular interactions between copies of the same protein, but also between different p24 proteins. Indeed it

has been proposed that oligomerization is required for the proper localization of p24 proteins (Füllerkrug *et al.*, 1999; Gommel *et al.*, 1999; Ciufó and Boyd, 2000; Emery *et al.*, 2000; Jenne *et al.*, 2002; Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012).

p24 proteins have been proposed to play a role in quality control of protein movement through the secretory pathway (Wen and Greenwald, 1999; Belden and Barlowe, 2001), cargo protein selection and packaging into transport vesicles (Schimmöller *et al.*, 1995; Muniz *et al.*, 2000; Takida *et al.*, 2008; Castillon *et al.*, 2011; Fujita *et al.*, 2011), the formation of COPI vesicles and retrograde Golgi–endoplasmic reticulum (ER) transport (Aguilera-Romero *et al.*, 2008), the formation of ER exit sites (ERES) (Lavoie *et al.*, 1999), and the biogenesis and maintenance of the Golgi apparatus (Mitrovic *et al.*, 2008; Koegler *et al.*, 2010). Therefore, p24 proteins are one of the most interesting groups of proteins involved in regulating the structure and function of the organelles of the secretory pathway. In addition, several publications have proposed a role for p24 proteins in early embryonic development in mice (Denzel *et al.*, 2000; Jerome-Majewska *et al.*, 2010), insulin biosynthesis and subsequent secretion in pancreatic beta cells (Zhang and Volchuk, 2010), or amyloid precursor metabolism and pathogenesis of Alzheimer disease (Chen *et al.*, 2006; Vetrivel *et al.*, 2007; Hasegawa *et al.*, 2010). p24 proteins have also been shown to interact with G protein-coupled receptors (GPCRs), including protease-activated receptors (PAR-1 and PAR-2), nucleotide P2Y receptors, and μ -opioid receptors (Luo *et al.*, 2007, 2011).

Over the years, p24 proteins have been proposed to function as cargo receptors, to concentrate cargo within COPI or COPII vesicles, but the trafficking of a putative cargo mediated by p24 proteins has only recently been demonstrated in mammals and yeast. In mammals, p24 proteins have been shown to form hetero-oligomeric complexes that bind to correctly remodelled glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchors to concentrate GPI-anchored proteins (GPI-APs) at ERES for their efficient packaging into COPII vesicles and transport to the Golgi (Fujita *et al.*, 2011). In the Golgi, at a lower pH, p24 complexes dissociate from GPI-APs, which are transported to the cell surface, while p24 proteins are recycled to the ER in COPI vesicles (Fujita *et al.*, 2011). In yeast, sorting of GPI-APs appears to be independent of p24 proteins. Instead, the p24 complex appears to act as an adaptor that facilitates vesicle formation by recruiting COPII components to specific ERES already enriched in GPI-APs (Castillon *et al.*, 2011).

Although there has been no general agreement regarding the nomenclature of p24 proteins, it is now clear that they can be classified into four different subfamilies by sequence homology, named p24 α , p24 β , p24 γ and p24 δ (Domiguez *et al.*, 1998; Strating *et al.*, 2009). Whereas animals and fungi have representatives in all four subfamilies, plants have only members of the p24 δ (nine in *Arabidopsis*) and the p24 β (two in *Arabidopsis*) subfamilies (Strating *et al.*, 2009). Following this nomenclature, the *Arabidopsis* p24 proteins have been named p24 δ 3 to p24 δ 11 (since the names p24 δ 1 and 2 have already been used) (Supplementary Fig. S1 at *JXB* online)

(Montesinos *et al.*, 2012). Chen and Zheng (2012) have proposed that the members of the delta subfamily belong to two different subclasses (which correspond to the two main branches of this subfamily), the δ 1 subclass (comprising p24 δ 1a–d; p24 δ 3–6 in the present study) and the δ 2 subclass (comprising p24 δ 2a–d; p24 δ 7–11 in the present study). On the other hand, the two *Arabidopsis* p24 proteins of the beta subfamily have been named p24 β 2 and p24 β 3 (since the name p24 β 1 has already been used) (Supplementary Fig. S1) (Montesinos *et al.*, 2012).

Interestingly, all *Arabidopsis* p24 proteins of the delta subfamily contain in their C-terminal tail a dilysine motif in the -3,-4 position, which binds COPI subunits (Contreras *et al.*, 2004a), and a diaromatic/large hydrophobic motif in the -7,-8 position, which binds COPII subunits but also potentiates COPI binding by the dilysine motif (Contreras *et al.*, 2004b). As a consequence, it has been proposed that p24 δ proteins show higher affinity for COPI than for COPII subunits (Contreras *et al.*, 2004b). Indeed, it has been shown that transiently expressed p24 δ 5 localizes mainly to the ER at the steady state as a consequence of highly efficient COPI-based recycling from the Golgi apparatus (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012). A similar ER localization has been shown for other members of the p24 δ 1 subclass (comprising p24 δ 3–p24 δ 6) (Chen and Zheng, 2012; Montesinos *et al.*, 2012). In contrast, members of the p24 δ 2 subclass (comprising p24 δ 7–p24 δ 11) have been proposed to localize to both the ER and Golgi (Chen and Zheng, 2012).

Using specific antibodies, endogenous p24 δ 5 and p24 δ 4 have been localized to the ER and p24 β 2 to the Golgi apparatus in *Arabidopsis* root tip cells by immunogold electron microscopy (Montesinos *et al.*, 2012). It has been shown that whereas the dilysine motif in the cytoplasmic tail determines the location of p24 δ 5 in the early secretory pathway, the luminal domain may contribute to its distribution downstream of the Golgi apparatus (Montesinos *et al.*, 2012). It has also been shown that p24 δ 5 and p24 β 2 interact with each other (via their coiled-coil domains) and exhibit coupled trafficking at the ER–Golgi interface. It has been proposed that p24 δ 5 and p24 β 2 may interact with each other at ERES for ER exit and coupled transport to the Golgi apparatus. Once in the Golgi, p24 δ 5 interacts very efficiently with the COPI machinery for retrograde transport back to the ER (Montesinos *et al.*, 2012).

In this study, the analysis has been extended to a second member of the p24 δ subfamily (p24 δ 9, p24 δ 2 subclass) and to the second member of the p24 β subfamily (p24 β 3). While transiently expressed p24 δ 9 localizes to the ER at steady state, p24 β 3 mainly localizes to the Golgi apparatus and exits the ER in a COPII-dependent manner. Immunogold electron microscopy in *Arabidopsis* root tip cells using specific antibodies shows that endogenous p24 δ 9 localizes mainly to the ER but also partially to the *cis*-Golgi. In contrast, endogenous p24 β 3 mainly localizes to the Golgi apparatus. By a combination of experiments using transient expression, knock-out mutants, and co-immunoprecipitation, it is proposed that *Arabidopsis* p24 proteins form different

heteromeric complexes for their coupled trafficking at the ER–Golgi interface. Evidence is also provided for a role for p24δ5 in retrograde Golgi–ER transport of the KDEL-receptor ERD2.

Materials and methods

Plant material

Arabidopsis thaliana ecotype Columbia (Col-0) and T-DNA mutant plants were grown in growth chambers as previously described (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). For immunogold electron microscopy, seedlings were grown on MS (Murashige and Skoog) medium containing 0.5% agar, and the roots were harvested after 5 d. To obtain a membrane fraction from *Arabidopsis* roots, seedlings were grown in liquid MS medium for 15 d. *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures (LT87) (Axelos *et al.*, 1992) were cultivated as described (Ortiz-Zapater *et al.*, 2006). Plants of *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana were grown from surface-sterilized seeds on MS medium with 2% (w/w) sucrose in a controlled room at 25 °C with cycles of 16 h light and 8 h darkness. Wild-type *Nicotiana benthamiana* plants were grown from surface-sterilized seeds on soil in a controlled room at 22 °C with a 16 h daylength.

Recombinant plasmid production

The coding sequences of red fluorescent protein (RFP)–p24δ9, cyan fluorescent protein/green fluorescent protein (CFP/GFP)–p24β2, or GFP/yellow fluorescent protein (YFP)–p24β3 were synthesized commercially *de novo* (Geneart AG), based on the sequences of GFP/CFP/YFP/RFP and that of the *Arabidopsis* p24 proteins At1g26690 (p24δ9), At3g07680 (p24β2), and At3g22845 (p24β3). All RFP-tagged proteins were tagged with monomeric RFP (mRFP) to prevent oligomerization. Similarly, only mGFP5 was used for GFP-tagged proteins. The sequence of the fluorophore was always located behind the coding sequence of the p24 signal sequence and the 5' extreme end of the mature p24 coding sequence (Supplementary Fig. S1 at JXB online). The coding sequences of RFP–p24δ9 or XFP–p24β2/β3 were cloned into the pBP30 vector (carrying the 35S promoter; Nebenführ *et al.*, 1999) through *Bgl*III/*Not*I.

Transient gene expression

Mesophyll protoplasts from *N. tabacum* var. SR1 leaf cells were isolated and transfected as previously described (Bubeck *et al.*, 2008). Unless otherwise stated, 1–50 µg of plasmid DNA was transfected and expressed for 20 h. Protoplasts from *A. thaliana* (LT87) cell suspension cultures were isolated as previously described (Axelos *et al.*, 1992). Where indicated, inhibitors (50 µM E-64, 100 µM MG-132) were added to the protoplast medium 30 min after electroporation, before the 20 h overnight incubation to allow for expression of the different constructs. Transient expression mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was performed in 4- to 6-week-old tobacco plants (wild type, *N. benthamiana*) as described previously (Lerich *et al.*, 2011).

Plasmids encoding marker proteins were: GFP–p24β2 and RFP–p24δ5 (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012), Man1–RFP and Man1–GFP (Nebenführ *et al.*, 1999), GFP–HDEL (Nebenführ *et al.*, 2000), ERD2–CFP/YFP (Brandizzi *et al.*, 2002), 6 kDa VP–CFP (Wei and Wang, 2008), Sec12 (Pimpl *et al.*, 2003), ARF1(T31N) (Lee *et al.*, 2003), and ARF1(Q71L) (Pimpl *et al.*, 2003).

Generation of antibodies

Rabbit antibodies were generated by Eurogentec (Belgium, <http://www.eurogentec.com>) using as antigens peptides corresponding to the N-terminus of p24δ9 (LHFELQSGRT) or p24β3 (LSVTVNDEE).

Confocal microscopy and immunofluorescence labelling

Imaging was performed using a Zeiss Axiovert LSM510 Meta confocal laser scanning microscope (CLSM). At the Metadector, the main beam splitters (HFT) 458/514 and 488/543 were used. The following fluorophores (excited and emitted by frame switching in the multitracking mode) were used: GFP (488 nm/496–518 nm), CFP (458 nm/464–486 nm), YFP (514 nm/529–550 nm), and RFP (543 nm/593–636 nm). Post-acquisition image processing was performed using the Zeiss LSM 5 image Browser (4.2.0.121) and CorelDrawX4 (14.0.0.567) or ImageJ (v.1.45m).

Immunogold electron microscopy

Root tips from *Arabidopsis* were high pressure frozen, freeze substituted, embedded, labelled, and post-stained as previously described (Bubeck *et al.*, 2008). Antibodies were used at the following dilutions: Nt-p24β3 (1:100) and Nt-p24δ9 (1:100). Micrographs were taken with a JEM1400 transmission electron microscope operating at 80 kV using a TVIPS F214 digital camera.

Preparation of membrane extracts, co-immunoprecipitation, pull-down experiments, and western blotting

Membrane fractions were obtained from *Arabidopsis* cell suspension cultures (LT87), *Arabidopsis* roots, or tobacco protoplasts as described previously (Montesinos *et al.*, 2012). Protein extracts were used for SDS–PAGE followed by western blot analysis, co-immunoprecipitation, or pull-down experiments. Co-immunoprecipitation experiments from *Arabidopsis* cultures were performed using magnetic beads (Dyna, Invitrogen), as described previously (Montesinos *et al.*, 2012). Pull-down experiments from tobacco protoplasts expressing RFP-tagged proteins were performed using RFP-Trap magnetic beads (Chromotek), following the recommendations of the manufacturer. For western blot analysis, nitrocellulose membranes were blocked with 5% non-fat dry milk/0.1 % Tween-20, incubated for 1 h at room temperature with the primary antibodies, washed, and incubated with peroxidase-labelled sheep anti-rabbit antibodies (GE Healthcare) for 1 h at room temperature. After washing, the immune complexes were detected by the SuperSignal West Pico chemiluminescent Substrate (Pierce, Thermo Scientific). The intensity of the bands obtained after western blot was quantified using the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). Western blot with an antibody against the plasma membrane ATPase (Montesinos *et al.*, 2012) was used as a loading control. Antibodies against RFP and GFP were obtained from Clontech and Life Technologies, respectively.

Mutant characterization

A line (Columbia, background) containing a T-DNA insertion in *p24δ10* (SALK_144586C, *p24δ10-1*) was identified from the SALK T-DNA collection (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). It was characterized by PCR as previously described (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). The primers used for this mutant were the following: 5'-CCGGTAACAATTACCATCACG-3' and 5'-ACGAAGTACCC AAGGTTCCAC-3'. The T-DNA left border and *Actin7* (*ACT7*, At5g09810) primers used were described previously (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). Reverse transcription–PCR (RT–PCR) analysis of the *p24δ10-1* mutant was performed as described (Ortiz-Masia *et al.*, 2007) to show the absence of *p24δ10*, and the primers used were 5'-CAAAGTGTATCGCCGAAGACATC-3' and 5'-GCATCC CTGCAACTCCTATGCAGA-3'. *p24δ4-1*, *p24δ5-1*, and *p24δδ5* mutant lines have been described previously (Montesinos *et al.*, 2012).

Due to the lack of p24β2 and p24β3 knock-out T-DNA insertion mutants in mutant collections, artificial microRNAs (amiRNAs) were used to knock down the expression of the genes. The β2-directed amiRNA construct was designed using a Web-based program (<http://wmd2.weigelworld.org>) (Schwab *et al.*, 2006; Ossowski *et al.*, 2008). The pRS300 plasmid was used as a template to create the amiRNA (Ossowski *et al.*, 2008).

Primer sequences were the following: I, 5'-ATAATCAGTGCAACGACGCGATCTCTCTTTTGTATTCC-3'; II, 5'-GATCGCGTCGTTTGCACTGATTTATCAAGAGAAATCAATGA-3'; III, 5'-GATCACGTCGTTTGCTCTGATTTTCACAGGTCGTGATATG-3'; and IV, 5'-GAAAATCAGAGCAA-ACGACGTGATCTACATATATTCCT-3'. The final amiRNA PCR product was digested at the *KpnI* and *BamHI* sites flanking the sequence encoding the amiRNA hairpin. The resultant product was ligated into the pCHF3 vector (Ortiz-Masiá *et al.*, 2007) using the *KpnI* and *BamHI* sites. The β 3-directed amiRNA construct was purchased from Open Biosystems (AMR4844-99730584). Transformation of *Arabidopsis* was conducted according to the floral dip method (Clough and Bent, 1998). Transgenic plants were selected on half-strength MS medium containing appropriate antibiotics. Transgenic lines segregating 3:1 for antibiotic resistance were selected in the T₂ generation of each transformation, and the T₃ homozygous generation was used to characterize silencing by RT-PCR as above. Primer sequences for p24 β 2 were 5'-AGGGTACGATCGTATTACTAG-3' and 5'-GACACGAGACATGCCGAGTTTGGC-3' and for p24 β 3 were 5'-CGACAAGCGAAGATCCATG-3' and 5'-GACACAAGACCTCGCTCTGAGG-3'. For further studies, the homozygous lines *amiR-p24 β 2* and *amiR-p24 β 3* that showed the best silencing for p24 β 2 and p24 β 3, respectively, were selected (Supplementary Fig. S6 at *JXB* online). RT-PCR analysis showed no silencing of p24 β 3 in the *amiR-p24 β 2* line, while 20% p24 β 2 silencing was detected in the *amiR-p24 β 3* line obtained from the amiRNA construct purchased from Open Biosystems (data not shown).

Results

Localization of endogenous p24 proteins of the delta and beta subfamilies

The localization of endogenous p24 δ 5 and p24 δ 4 (p24 δ subfamily) and p24 β 2 (p24 β subfamily) in *Arabidopsis* root cells was previously shown (Montesinos *et al.*, 2012). The localization of p24 δ 9, in a branch of the p24 δ subfamily different from that of p24 δ 5 or p24 δ 4, and of p24 β 3, the second member of the p24 β subfamily in *Arabidopsis*, has now been investigated. To this end, peptide antibodies were generated against the N-terminus of both proteins, which, in contrast to the C-terminus, shows a high variability among different p24 proteins (Supplementary Fig. S1 at *JXB* online). p24 proteins were extracted from membranes of *Arabidopsis* cell suspension cultures or from *Arabidopsis* roots. As shown in Fig. 1, antibodies against the N-terminus of p24 δ 9 recognized a protein of the expected molecular weight (24 kDa) in both membrane extracts, while antibodies against the N-terminus of p24 β 3 recognized a protein with an apparent molecular weight of ~22 kDa. Interestingly, p24 β 2 and p24 β 3 showed a slightly different electrophoretic mobility, which in addition was also different from that of p24 δ 5 and p24 δ 9 (Fig. 1). These differences in electrophoretic mobility were also obvious when the luminal N-terminal portion of both p24 δ 5 and p24 β 2 with a C-terminal (His)₆-tag was expressed in bacteria (Supplementary Fig. S2 at *JXB* online). Bacterial extracts were used to characterize further the specificity of the antibodies. As shown in Supplementary Fig. S2, antibodies against the N-terminus of p24 δ 9 did not recognize the N-terminus of p24 δ 5 (in contrast to Nt-p24 δ 5 or His antibodies), while antibodies against the N-terminus of p24 β 3 did not recognize the N-terminus of p24 β 2 (in contrast to Nt-p24 β 2 or His

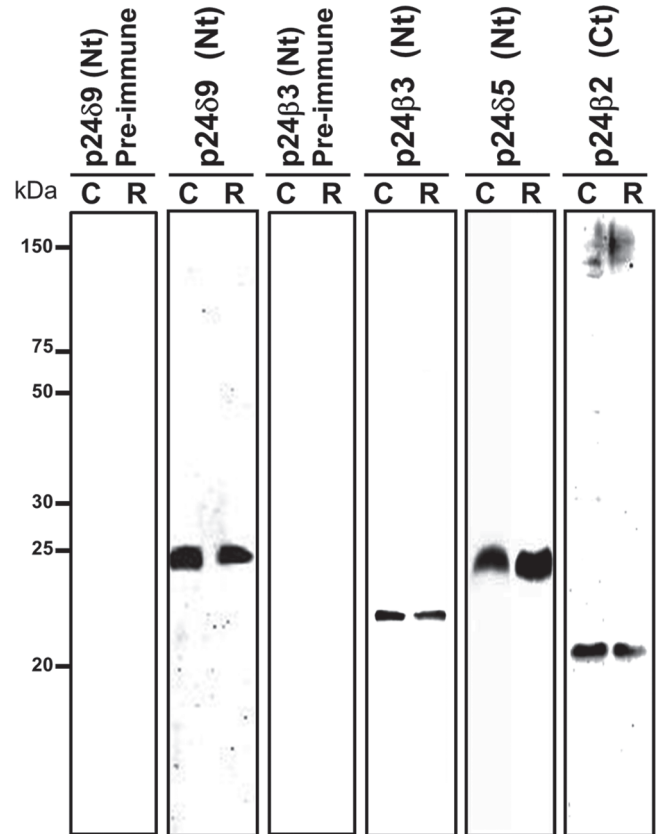


Fig. 1. Characterization of antibodies against *Arabidopsis* p24 proteins. Protein extracts were obtained from membranes of *Arabidopsis* cell suspension cultures (C) or *Arabidopsis* roots (R), as described in the Materials and methods, and analysed by SDS-PAGE (14% acrylamide) and western blotting with antibodies against the p24 δ 9 N-terminus and p24 β 3 N-terminus, or with the corresponding pre-immune sera. Western blotting with antibodies against p24 δ 5 and p24 β 2 (Montesinos *et al.*, 2012) is also shown. Note the slightly different electrophoretic mobility of p24 δ 5/p24 δ 9, p24 β 2, and p24 β 3.

antibodies). These antibodies were used to localize p24 δ 9 and p24 β 3 by immunogold labelling on sections cut from cryo-fixed *Arabidopsis* roots. As shown in Fig. 2A, the N-terminal p24 δ 9 antibody mainly labelled ER membranes, as was found previously for endogenous p24 δ 5 and p24 δ 4 (Montesinos *et al.*, 2012). Occasionally, some labelling was also seen on the *cis*-Golgi. In contrast, the N-terminal p24 β 3 antibody mainly labelled the Golgi apparatus, although some labelling could also be seen at ER membranes (Fig. 2B). This localization is very similar to that previously shown for endogenous p24 β 2 (Montesinos *et al.*, 2012).

Trafficking properties of p24 proteins of the delta subfamily

It was previously demonstrated that transiently expressed RFP-p24 δ 5 localizes to the ER at steady state but cycles between the ER and Golgi (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012). *Arabidopsis* p24 proteins of the delta subfamily

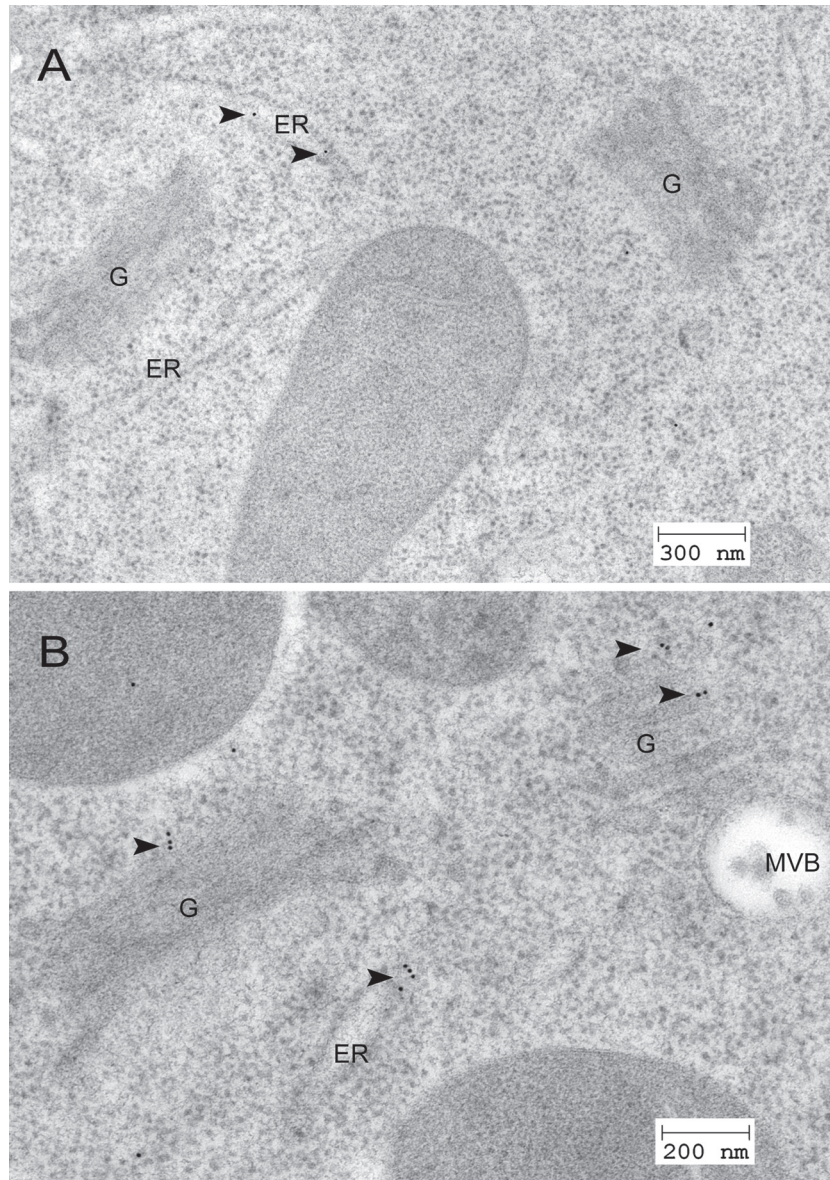


Fig. 2. Localization of p24 δ 9 and p24 β 3 by immunogold labelling on cryofixed *Arabidopsis* roots. (A) Labelling with antibodies against Nt-p24 δ 9 at the ER. (B) Labelling with antibodies against Nt-p24 β 3 at the Golgi apparatus and the ER. Arrowheads point to gold particles. ER, endoplasmic reticulum; G, Golgi apparatus; MVB, multivesicular body.

have been suggested to belong to two different subclasses, p24 δ 1 and p24 δ 2, with different localization and trafficking properties (Chen and Zheng, 2012). In particular, members of the p24 δ 1 subclass (which comprise p24 δ 3–p24 δ 6) localized exclusively to the ER, while members of the p24 δ 2 subclass (which comprise p24 δ 7–p24 δ 11) localized to both the ER and Golgi when transiently expressed in tobacco leaf epidermal cells (Chen and Zheng, 2012). Therefore, the trafficking properties of RFP–p24 δ 5 (p24 δ 1 subclass) and RFP–p24 δ 9 (p24 δ 2 subclass) were compared. In marked contrast to the data of Chen and Zheng (2012), it was found that transiently expressed RFP–p24 δ 9 localizes exclusively to the ER, both in tobacco protoplasts (Fig. 3A–F; Supplementary Fig. S3 at *JXB* online) and in tobacco leaf epidermal cells (Fig. 3J–O). In both cases, RFP–p24 δ 9 co-localized extensively with the

ER markers GFP/YFP–HDEL but not with the Golgi markers ManI–GFP/YFP. At low expression levels, it showed a pattern nearly indistinguishable from that of RFP–p24 δ 5. At higher expression levels, it partially localized to dots, or even to ring-like structures, probably artefacts of overexpression. However, none of these structures was found to co-localize with the Golgi markers ManI–GFP/YFP (Supplementary Fig. S3). Therefore, transiently expressed RFP–p24 δ 9 seems to localize exclusively to the ER, like RFP–p24 δ 5 (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012).

In order to investigate if transiently expressed RFP–p24 δ 9 also cycles between the ER and Golgi, as does RFP–p24 δ 5, RFP–p24 δ 9 was co-expressed with the GTP-restricted ARF1(Q71L) mutant, which prevents COPI-mediated Golgi–ER recycling (Pimpl *et al.*, 2003). This treatment has

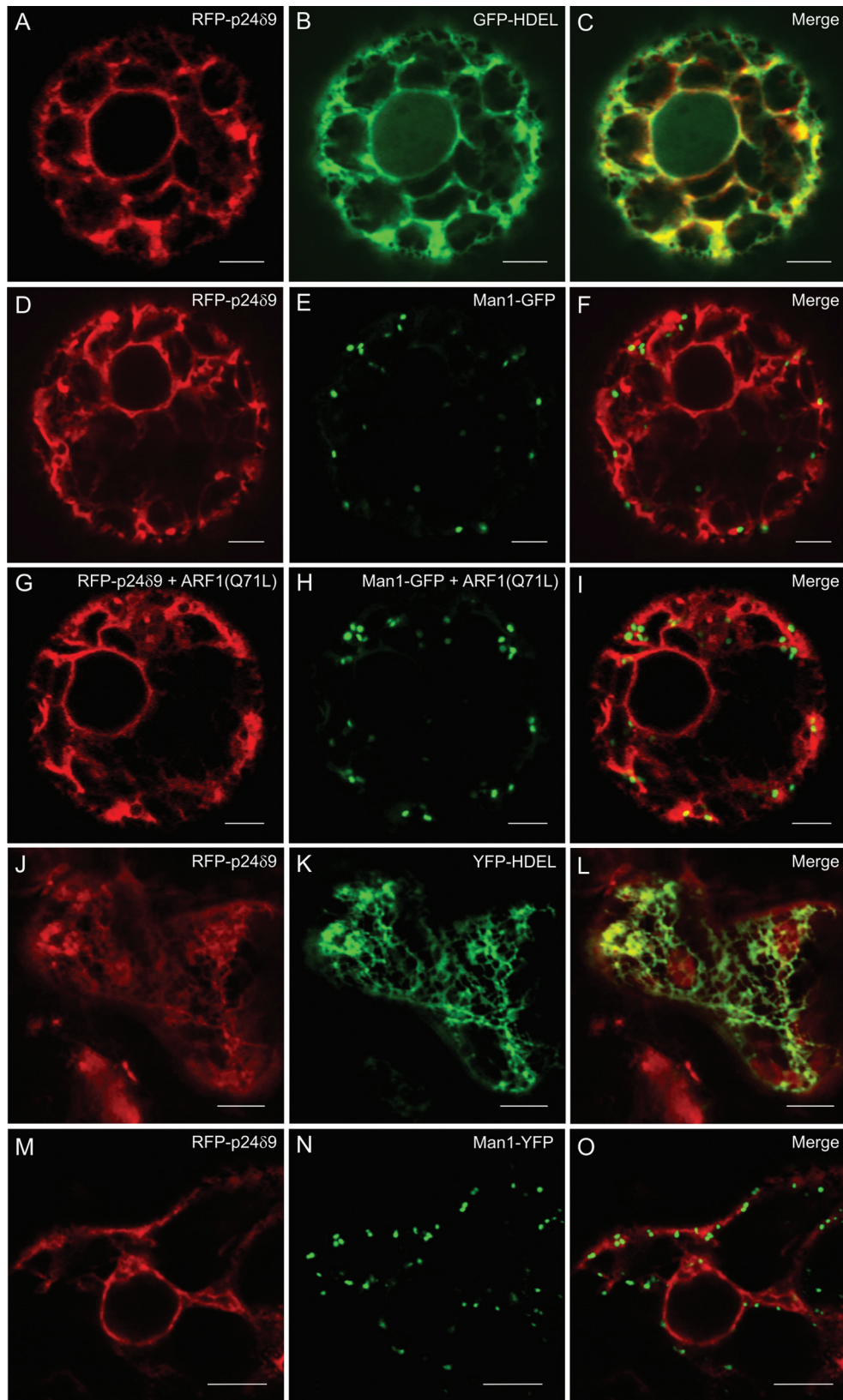


Fig. 3. Localization of RFP-p24 δ 9. (A–I) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–C) RFP-p24 δ 9 (A) co-localizes extensively with the ER marker GFP-HDEL (B) (merged image in C). (D–F) RFP-p24 δ 9 (D) does not co-localize with the Golgi marker Man1-GFP (E) (merged image in F). (G–I) RFP-p24 δ 9 (G) does not co-localize with the Golgi marker Man1-GFP (H) upon ARF1 (Q71L) expression (merged image in I). (J–O) Transient gene expression in tobacco leaf epidermal cells. (J–L) RFP-p24 δ 9 (J) co-localizes extensively with the ER marker YFP-HDEL (K) (merged image in L). (M–O) RFP-p24 δ 9 (M) does not co-localize with the Golgi marker Man1-YFP (N) (merged image in O). Scale bars=5 μ m.

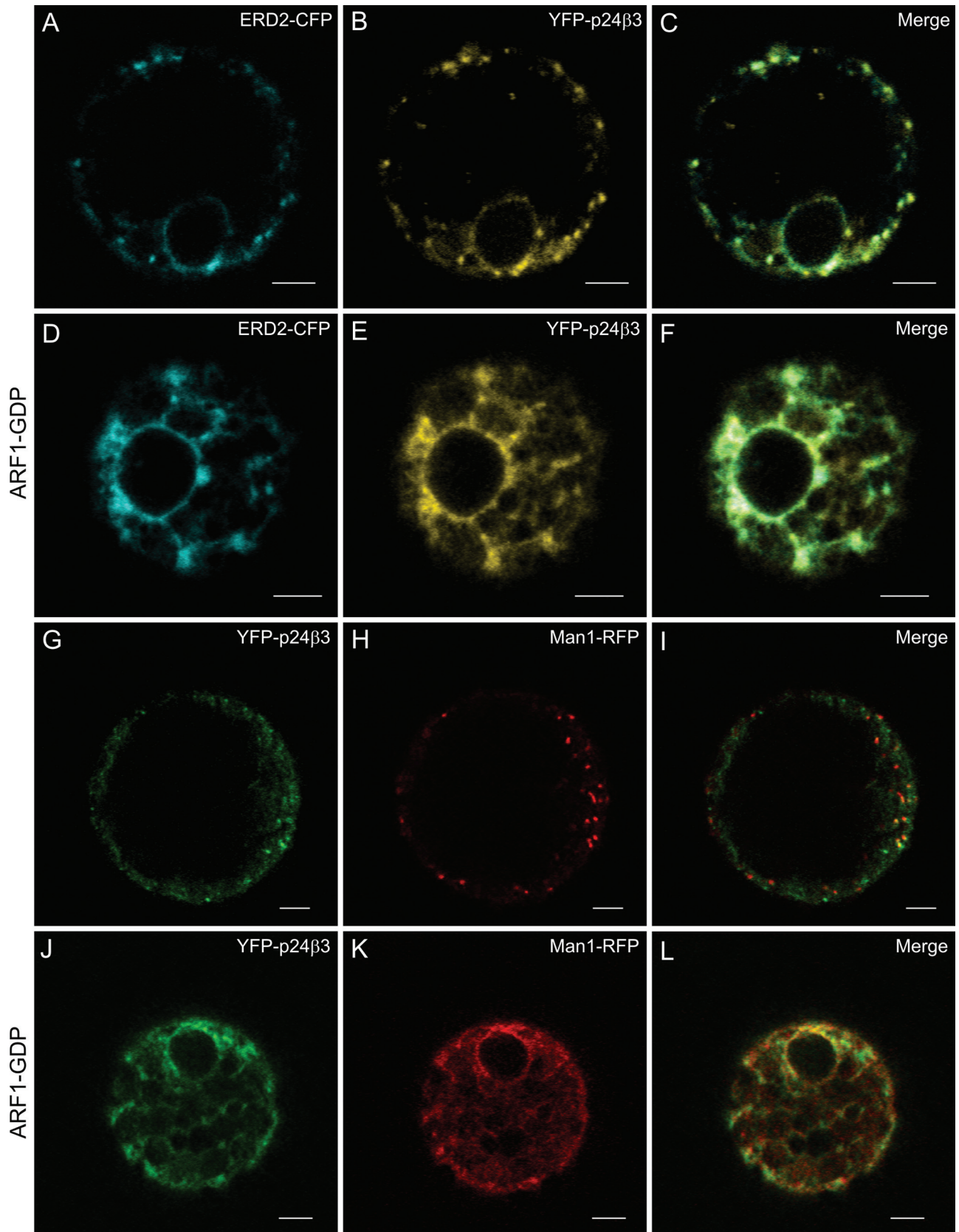


Fig. 4. Localization of YFP-p24 β 3. (A–L) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–C) YFP-p24 β 3 (B) co-localizes with the Golgi marker ERD2-CFP (A) in punctate structures (merged image in C). (D–F) YFP-p24 β 3 (E) and ERD2-CFP (D) relocalize to the ER upon co-expression with the ARF1-GDP mutant (merged image in F). (G–I) YFP-p24 β 3 (G) co-localizes partially with the Golgi marker Man1-RFP (H) in punctate structures (merged image in I). (J–L) YFP-p24 β 3 (J) and Man1-RFP (K) relocalize to the ER upon co-expression with the ARF1-GDP mutant (merged image in L). Scale bars=5 μ m.

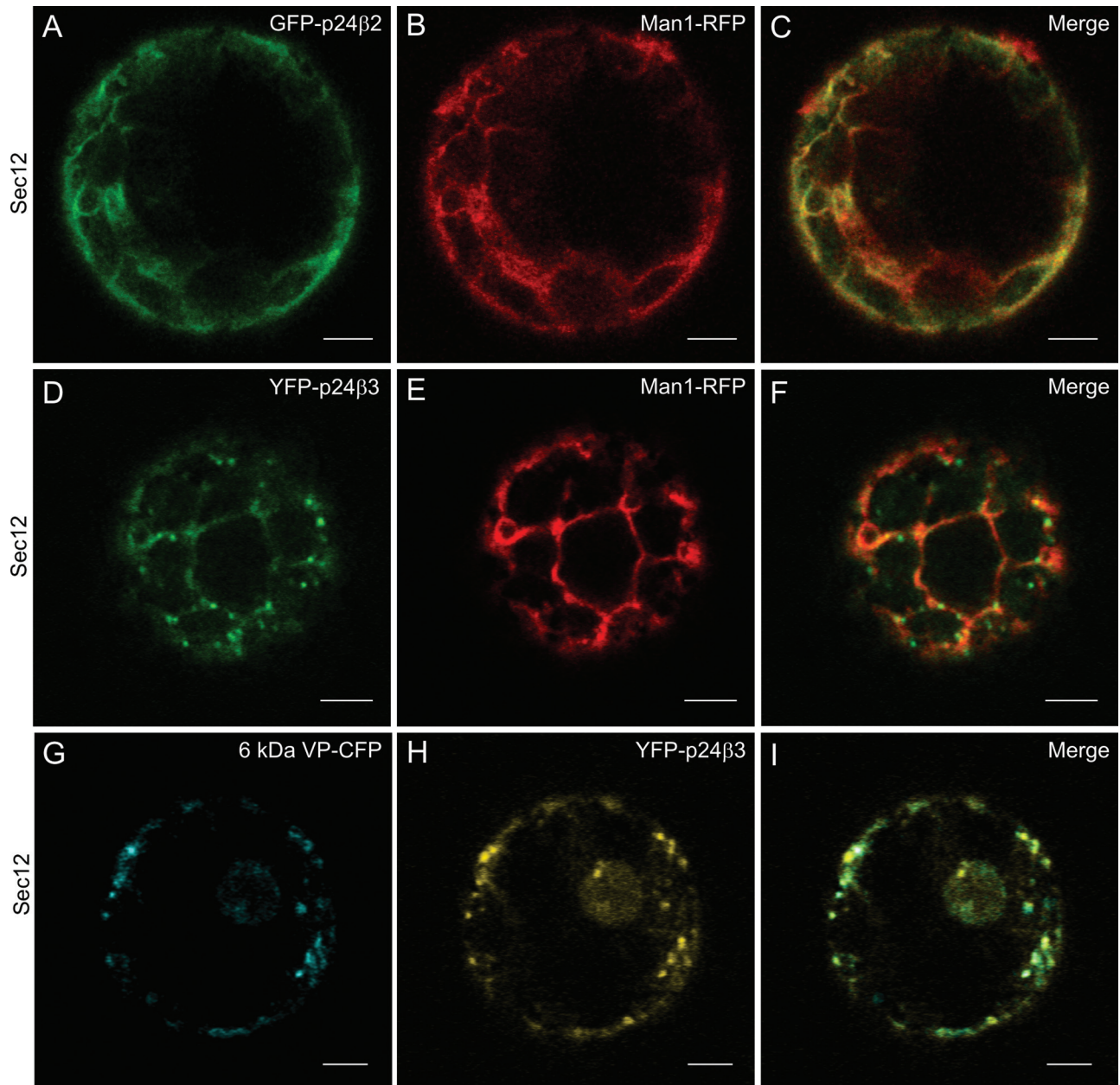


Fig. 5. ER export of p24 proteins of the beta subfamily is COPII dependent. (A–I) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–C) GFP–p24 β 2 (A) co-localizes with ManI–RFP (B) in the ER upon Sec12 overexpression (merged image in C). (D–F) YFP–p24 β 3 (D) co-localizes with ManI–RFP (E) in the ER upon Sec12 overexpression, but also in punctate structures (merged image in F). (G–I) YFP–p24 β 3 (H) co-localizes partially with the COPII/ERES marker 6 kDa VP–CFP (G) in punctate structures upon Sec12 overexpression (merged image in I). Scale bars=5 μ m.

been shown to redistribute RFP–p24 δ 5 partially to the Golgi apparatus (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012). Interestingly, this treatment did not change the ER localization of RFP–p24 δ 9 (Fig. 3G–I).

Trafficking properties and stability of p24 proteins of the beta subfamily

The trafficking properties of (X)FP–p24 β 3 were also investigated. Similar to GFP–p24 β 2, YFP–p24 β 3 showed a punctate pattern, which partially co-localized with the

Golgi markers ERD2–CFP (Fig. 4A–C) or ManI–RFP (Fig. 4G–I). When co-expressed with the GDP-restricted ARF1(T31N) mutant, which causes relocation of Golgi markers to the ER (Lee *et al.*, 2002), YFP–p24 β 3 completely redistributed to the ER, where it co-localized with both ERD2–CFP (Fig. 4D–F) and Man I–RFP (Fig. 4J–L). This was also the case for YFP–p24 β 2 (Supplementary Fig. S4 at *JXB* online). These data suggest that transiently expressed p24 β 2 and p24 β 3 mainly localize to the Golgi apparatus, as had been observed for the endogenous proteins. When GFP–p24 β 2 or YFP–p24 β 3 was co-expressed with Sec12,

to inhibit COPII-dependent ER export, both proteins were mainly localized to the ER, together with the Golgi marker Man I-RFP (Fig. 5A–F). This suggests that both proteins exit the ER in a COPII-dependent manner. In contrast to GFP-p24 β 2, co-expression of YFP-p24 β 3 and Sec12 not only led to a complete reticular pattern, but some dots were also very obvious (Fig. 5D–F). To test for the identity of these dots, YFP-p24 β 3 and Sec12 were co-expressed with 6 kDa VP-CFP, a COPII/ERES marker (Lerich *et al.*, 2011). As shown in Fig. 5G–I, many of the YFP-p24 β 3 punctae co-localized with 6 kDa VP-CFP, suggesting that at least a fraction of YFP-p24 β 3 may accumulate at ERES under these conditions.

As had been observed with GFP-p24 β 2 (Montesinos *et al.*, 2012), the signal obtained for YFP-p24 β 3 in the CLSM when expressed alone was relatively low. When the levels of GFP-p24 β 3 were analysed by western blotting, a relatively low signal was also detected (Fig. 6, lane 2). The stability of p24 proteins depends on their interactions with other family members (Montesinos *et al.*, 2012). Therefore, transiently expressed individual proteins may be more susceptible to protein degradation. To investigate the mechanisms involved in the degradation of p24 β 2 and p24 β 3, both proteins were expressed in the presence of MG-132, a proteasome inhibitor, or E-64, an inhibitor of cysteine proteinases. Western blot analysis shows that the levels of both p24 β 2 and p24 β 3 significantly increased in the presence of E-64 (Fig. 6, lane 4), but not in the presence of MG-132 (Fig. 6, lane 3), suggesting

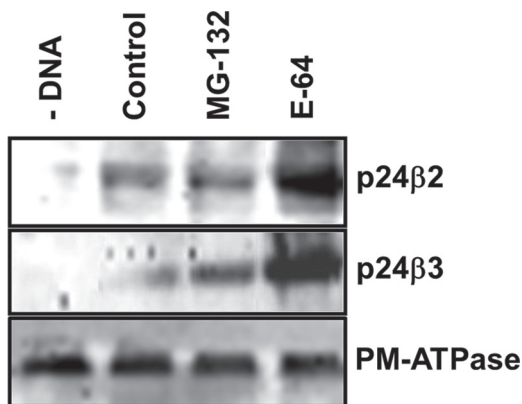


Fig. 6. Stability of p24 proteins of the beta subfamily. Tobacco mesophyll protoplasts were electroporated in the absence (–DNA) or the presence of 30 μ g of plasmid DNAs corresponding to GFP-p24 β 2 (upper panel) or GFP-p24 β 3 (middle panel), in the absence (Control) or the presence of MG-132 or E-64. At 24 h post-electroporation, protoplasts were washed and homogenized to obtain a post-nuclear supernatant, which was then centrifuged to obtain a total membrane fraction. Membranes were extracted in Laemmli sample buffer and analysed by SDS-PAGE (12% acrylamide) and western blot analysis with antibodies against Ct-p24 β 2 or GFP (to detect p24 β 3). A 30 μ g aliquot of protein was loaded for each of the extracts. Western blotting with an antibody against the plasma membrane (PM) ATPase was used as a loading control (lower panel).

that both proteins are mainly degraded by cysteine proteinases in acidic compartments.

Interactions between different members of the p24 family in Arabidopsis

p24 proteins are thought to form hetero-oligomeric complexes, via their coiled-coil domains, which are essential for their trafficking and localization. It has been previously shown that p24 δ 5 and p24 β 2 interact with each other, probably at ERES, for their coupled transport to the Golgi apparatus (Montesinos *et al.*, 2012). This analysis has now been extended to other members of the p24 δ and p24 β sub-families. As shown in Fig. 7A–C, when GFP-p24 β 2 was co-expressed with RFP-p24 δ 9, the signal of GFP-p24 β 2 was clearly more intense than when expressed alone, but still localized to punctae. In addition, it was observed that RFP-p24 δ 9 showed its typical ER pattern but also localized to the same punctae under these conditions (see also Table 1A). The punctae where both proteins co-localize overlapped extensively with the Golgi marker ERD2–YFP (Fig. 8A–H), but also with the COPII/ERES marker 6 kDa VP-CFP (Fig. 8I–P). This suggests that GFP-p24 β 2 is able to enhance the ER exit of RFP-p24 δ 9 and its transport to the Golgi apparatus, as happens with RFP-p24 δ 5 (Montesinos *et al.*, 2012). This was also the case when GFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 9 were transiently co-expressed in tobacco leaf epidermal cells: while RFP-p24 δ 9 localized exclusively to the ER when expressed individually (Fig. 3J–O), it also localized to punctae when co-expressed with CFP-p24 β 2. Under these conditions, the punctae containing CFP-p24 β 2 showed an almost complete co-localization with RFP-p24 δ 9 (Supplementary Fig. S5 at JXB online). Whether GFP-p24 β 3 showed the same trafficking characteristics as GFP-p24 β 2 was next investigated in co-expression experiments. As shown in Fig. 7D–I, GFP-p24 β 3 punctae showed only a partial co-localization with either RFP-p24 δ 5 or RFP-p24 δ 9 (see also Table 1A). Strikingly, GFP-p24 β 3 did not significantly change the ER localization of RFP-p24 δ 5 or RFP-p24 δ 9, in contrast to GFP-p24 β 2 (Fig. 7D–I).

Triple or quadruple co-expression experiments were performed next. First, the two p24 β proteins (CFP-p24 β 2 and YFP-p24 β 3) were co-expressed with either RFP-p24 δ 5 (Fig. 9A–D) or RFP-p24 δ 9 (Fig. 9E–H) (triple co-expression). In both cases, there was a partial co-localization of the three proteins in punctate structures. When CFP-p24 β 2, YFP-p24 β 3, RFP-p24 δ 5, and RFP-p24 δ 9 were expressed together (quadruple co-expression) (Fig. 9I–P), various degrees of co-localization between these proteins were obtained (see Table 1B). However, the most striking observation was that CFP-p24 β 2 remained mostly punctate, while in most of the protoplasts YFP-p24 β 3 was clearly less punctate and much more reticular. Under these conditions, RFP fluorescence (including both RFP-p24 δ 5 and RFP-p24 δ 9) was mostly reticular (Fig. 9I–P). Finally, the two p24 δ proteins (RFP-p24 δ 5 and RFP-p24 δ 9) were co-expressed with either GFP-p24 β 2 or GFP-p24 β 3. Under these conditions, GFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 5/9 extensively co-localized in

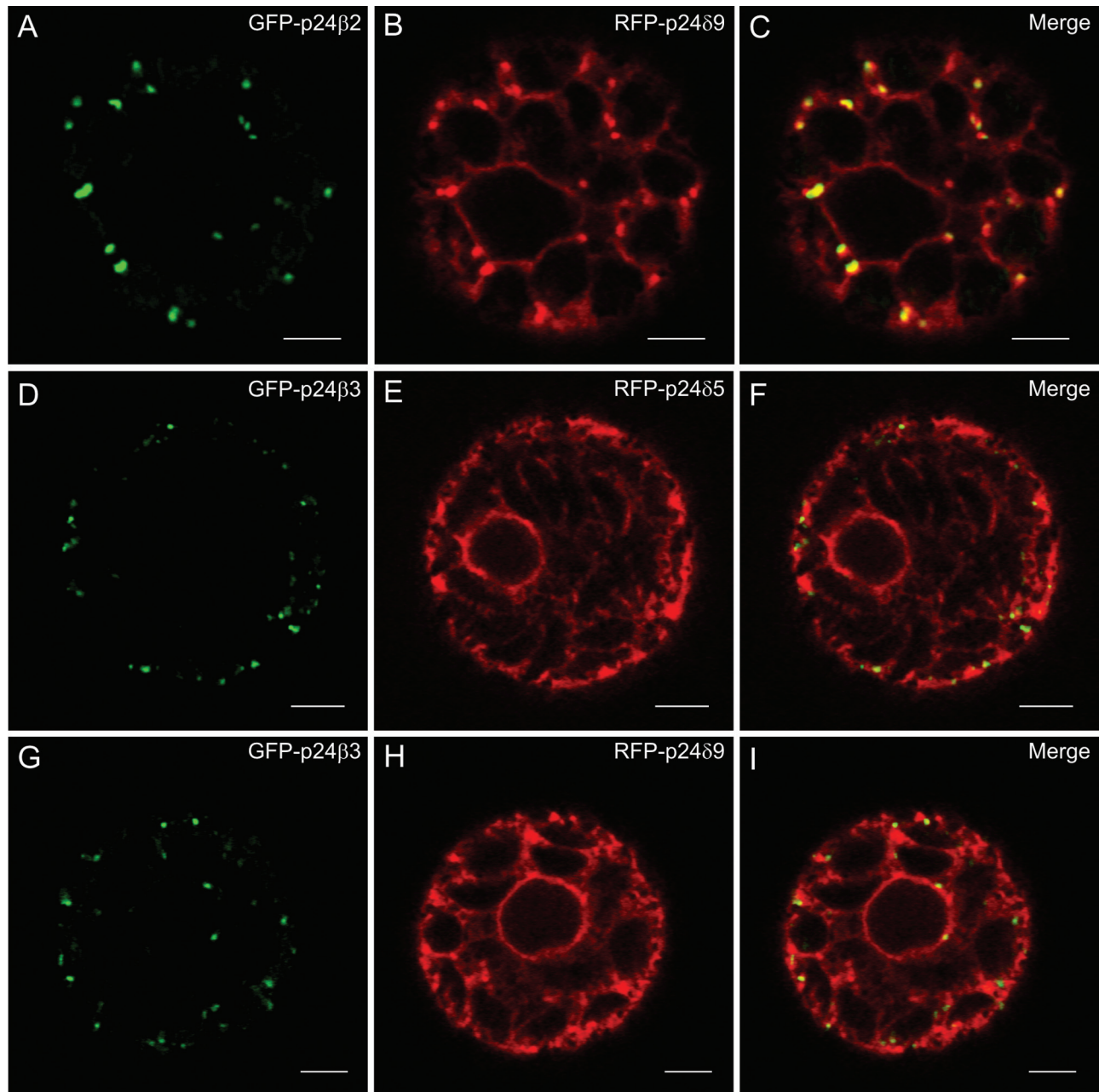


Fig. 7. Co-expression of p24 proteins of the beta and delta subfamilies (I). (A–I) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–C) GFP–p24 β 2 (A) co-localizes extensively with RFP–p24 δ 9 (B) in punctate structures (merged image in C). (D–I) GFP–p24 β 3 (D, G) partially co-localizes with RFP–p24 δ 5 (E) or RFP–p24 δ 9 (H) (merged images in F and I). Scale bars=5 μ m.

punctate structures (Fig. 10A–F). In contrast, GFP–p24 β 3 was only partially punctate and significantly redistributed to the ER, where it partially co-localized with RFP–p24 δ 5/9 (Fig. 10G–L).

To quantify whether the levels of GFP–p24 β proteins might depend on their trafficking properties, protoplasts were analysed by western blotting following the co-expression experiments shown above (Fig. 11). Since the N-terminal p24 β 3 antibodies could not detect transiently expressed GFP–p24 β 3 by western blotting, GFP antibodies, which recognized both GFP–p24 β 2 and GFP–p24 β 3, were used instead. The results are summarized in Table 2. As has been

shown previously (Montesinos *et al.*, 2012), the levels of GFP–p24 β 2 increased significantly upon co-expression with RFP–p24 δ 5. It has now been found that the levels of GFP–p24 β 2 also increased significantly when co-expressed with RFP–p24 δ 9. On the other hand, the levels of GFP–p24 β 2 or GFP–p24 β 3 were not significantly increased when both proteins were expressed together. In the case of GFP–p24 β 3, its levels increased upon co-expression with RFP–p24 δ 5 or RFP–p24 δ 9, but increased much more in the quadruple co-expression.

Previous studies where a single member of the p24 family had been deleted or knocked down showed that the protein

Table 1. Co-localization of RFP-p24 δ 5/ δ 9 and GFP-p24 β 2/ β 3 in co-expression experiments

Combination of proteins		Manders coefficient	
A	B	M1 (A overlapping with B)	M2 (B overlapping with A)
GFP-p24 β 2	RFP-p24 δ 9	0.84 \pm 0.05	0.36 \pm 0.07
GFP-p24 β 3	RFP-p24 δ 9	0.47 \pm 0.10	0.14 \pm 0.06
GFP-p24 β 3	RFP-p24 δ 5	0.45 \pm 0.07	0.15 \pm 0.06

Combination of proteins				Co-localization (%)
RFP-p24 δ 5	RFP-p24 δ 9	YFP-p24 β 3	CFP-p24 β 2	9.19 \pm 2.64
RFP-p24 δ 5	RFP-p24 δ 9	YFP-p24 β 3	–	16.06 \pm 2.82
RFP-p24 δ 5	RFP-p24 δ 9	–	CFP-p24 β 2	30.31 \pm 3.71
–	–	YFP-p24 β 3	CFP-p24 β 2	44.44 \pm 3.31

In A, measurements were made on 10 separate cells upon double co-expression (Fig. 7), and calculated with ImageJ 1.47i and the plugins JACoP (Bolte S, Cordeliers FP 2006) and PSC Colocalization (French *et al.*, 2008).

In B, measurements were made on 5–10 separate cells upon quadruple co-expression (Fig. 9I–P), out of four independent experiments, and calculated with ImageJ 1.47i and the plugin ColocalizeRGB.

level of other family members was reduced, which probably reflects the fact that these p24 proteins interact with each other in hetero-oligomeric complexes (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch *et al.*, 1999; Denzel *et al.*, 2000; Vetrivel *et al.*, 2007; Takida *et al.*, 2008; Koegler *et al.*, 2010; Jerome-Majewska *et al.*, 2010; Zhang and Volchuk, 2010). Therefore, the protein levels of p24 δ 4, p24 δ 5, p24 δ 9, p24 β 2, or p24 β 3 were examined in knock-out/knock-down mutants. T-DNA insertion knock-out mutants lacking p24 δ 5 (*p24 δ 5-1*) and p24 δ 4 (*p24 δ 4-1*) had already been characterized (Montesinos *et al.*, 2012). As no T-DNA insertion knock-out mutant for p24 δ 9 (δ 2 subclass) was found in the Salk collection, a knock-out mutant for p24 δ 10 (δ 2 subclass) was analysed (Supplementary Fig. S6 at *JXB* online). Plants from the three lines resembled wild-type plants under standard growth conditions (Supplementary Fig. S6). As T-DNA insertion mutants for p24 β 2 or p24 β 3 are not available in mutant collections, amiRNA was used to knock down *p24 β 2* or *p24 β 3* (Supplementary Fig. S6). No distinct phenotype was observed in *amiR-p24 β 2* or *amiR-p24 β 3* knock-down lines when compared with wild-type plants under standard growth conditions (Supplementary Fig. S6). Protein extracts from roots of wild-type (Col-0) plants, T-DNA knock-out insertion mutants, and *amiR-p24 β 2* and *amiR-p24 β 3* lines were analysed by western blotting with the corresponding antibodies (Fig. 12). It was previously shown that the T-DNA mutant lacking p24 δ 5 showed p24 δ 4 levels comparable with those of the wild type. The same was true for the levels of p24 δ 5 in the p24 δ 4 mutant (Montesinos *et al.*, 2012). However, both mutants (*p24 δ 4-1* and *p24 δ 5-1*) showed reduced levels of p24 δ 9, p24 β 2, and p24 β 3 (Fig. 12). In contrast, the T-DNA mutant lacking p24 δ 10 did not show reduced protein levels of p24 δ 5, p24 β 2, or p24 β 3, but showed a 2.5-fold increase in the protein levels of the highly related p24 δ 9 (Fig. 12). Finally, the lines expressing amiRNAs were analysed for p24 β 2 or p24 β 3. Expression of p24 β 2 and p24 β 3

was reduced by ~85% in the *amiR-p24 β 2* and *amiR-p24 β 3* lines, respectively (Fig. 12). In addition, the *amiR-p24 β 2* line showed reduced protein levels of p24 δ 5, p24 δ 9, and p24 β 3, while the *amiR-p24 β 3* line showed reduced protein levels of p24 δ 5, p24 δ 9, and p24 β 2 (Fig. 12). These results suggest that p24 proteins do interact with other family members to form heteromeric complexes.

To test biochemically for interactions between endogenous p24 proteins, co-immunoprecipitation experiments were performed using C-terminal p24 δ 5 or p24 β 2 antibodies (Montesinos *et al.*, 2012). As shown in Fig. 13A, antibodies against the C-terminus of p24 β 2 caused the co-immunoprecipitation of p24 δ 5, p24 δ 9, and p24 β 3, while antibodies against the C-terminus of p24 δ 5 caused the co-immunoprecipitation of p24 δ 9, p24 β 2, and p24 β 3. As a control, control beads or N-terminal p24 β 2 antibodies, which have previously been shown to be unable to immunoprecipitate p24 β 2 (Montesinos *et al.*, 2012), were used. Pull-down experiments were also performed using membrane fractions from protoplasts co-expressing RFP-p24 δ 5 or RFP-p24 δ 9 and GFP-p24 β 2 or GFP-p24 β 3, using an RFP-trap for the pull-down of RFP-tagged proteins (p24 δ 5 or p24 δ 9) and GFP antibodies for the western blot analysis of the interacting proteins (p24 β 2 or p24 β 3). As shown in Fig. 13B, RFP-p24 δ 5 pulled-down GFP-p24 β 2 and, to a lesser extent, GFP-p24 β 3, but not ManI-GFP (used as a negative control). Similarly, RFP-p24 δ 9 pulled-down both GFP-p24 β 2 and GFP-p24 β 3 (Fig. 13B). This suggests that heterotypic interactions can occur between *Arabidopsis* p24 proteins from the beta and delta subfamilies.

p24 δ 5 may play a role in retrograde Golgi-ER transport of the KDEL-receptor ERD2

Finally, a functional analysis of p24 proteins in *Arabidopsis* was attempted. Since the single knock-down/knock-out mutants that were characterized did not show any obvious

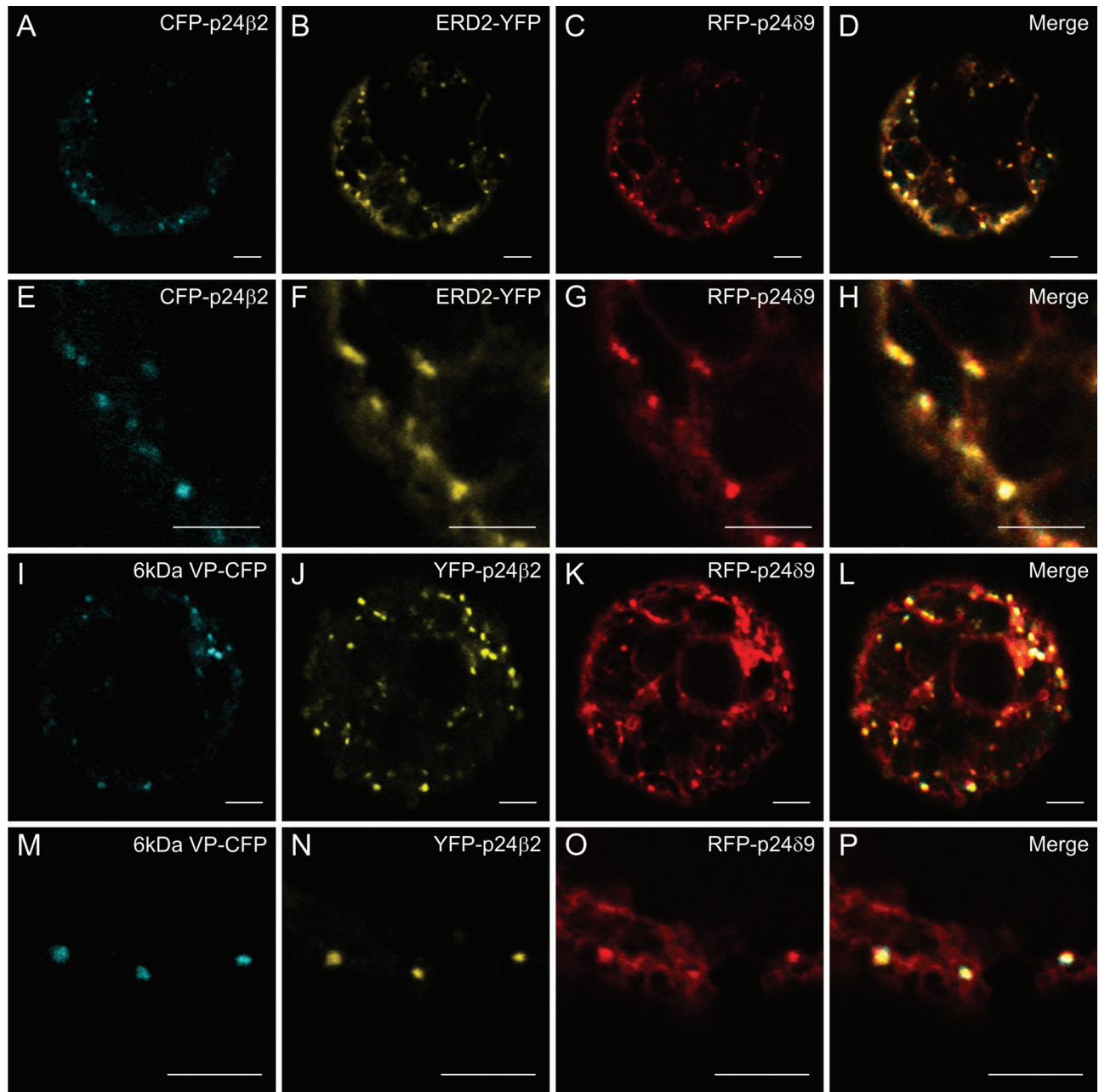


Fig. 8. (X)FP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 9 localize partially to ERES and Golgi. (A–P) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–H) CFP-p24 β 2 (A, E) and RFP-p24 δ 9 (C, G) co-localize with the Golgi marker ERD2–YFP (B, F) in punctate structures (merged images in D and H). (I–P) YFP-p24 β 2 (J, N) and RFP-p24 δ 9 (K, O) co-localize with the ERES/COPII marker 6kDa VP–CFP (I, M) in punctate structures (merged images in L and P). Scale bars=5 μ m.

phenotypic alteration, a gain-of-function approach was tried, by overexpressing specific p24 proteins and testing for an influence on the trafficking of putative cargos. For these studies, the focus was on p24 δ 5, since its trafficking was previously characterized in the early secretory pathway and mutants were readily available (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012). However, the drawback of this strategy is the fact that specific p24 cargos have not yet been identified in plants. Since p24 proteins of the delta subfamily have been proposed to play a role in retrograde

Golgi–ER transport (Majoul *et al.*, 1998, 2001; Aguilera-Romero *et al.*, 2008), it was thought that one good candidate might be ERD2, a receptor which retrieves KDEL/HDEL-containing cargo from the Golgi to the ER. Indeed, there is one previous report showing that mammalian p23 (p24 δ subfamily) interacts with ERD2 and is involved in its retrograde Golgi–ER transport (Majoul *et al.*, 1998, 2001). Therefore, ERD2–YFP was transiently co-expressed with increasing amounts of RFP-p24 δ 5. When expressed alone, ERD2–YFP localized mainly (76% of analysed protoplasts)

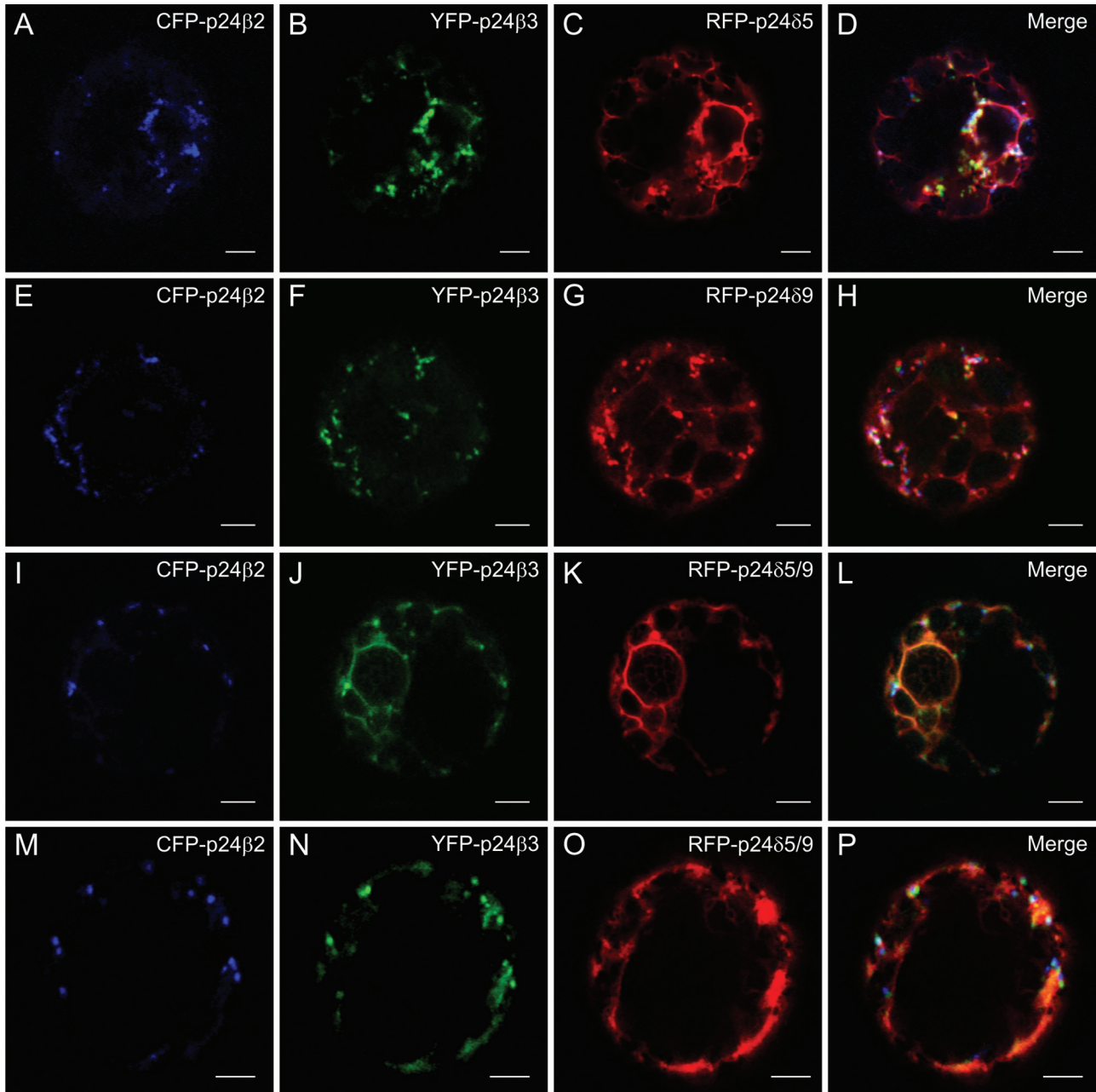


Fig. 9. Co-expression of p24 proteins of the beta and delta subfamilies (II). (A–P) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–D) CFP–p24β2 (A), YFP–p24β3 (B), and RFP–p24δ5 (C) co-localize partially in punctate structures (merged image in D). (E–H) CFP–p24β2 (E), YFP–p24β3 (F), and RFP–p24δ9 (G) co-localize partially in punctate structures (merged image in H). (I–P) Co-expression of CFP–p24β2 (I, M), YFP–p24β3 (J, N), and RFP–p24δ5/9 (K, O) (merged images in L and P) (see text for details). Scale bars=5 μm.

to punctate Golgi structures, with a faint ER staining (Fig. 14J–K). Overexpression of RFP–p24δ5 produced a significant redistribution of ERD2–YFP from the Golgi to the ER. As quantified in Fig. 14K, Golgi localization of ERD2–YFP decreased to 38% in the presence of RFP–p24δ5. In the remaining protoplasts, ERD2–YFP localized either to the ER (17% of the protoplasts) or to both the ER and Golgi (45% of the protoplasts) (Fig. 14A–C). These experiments suggest that p24δ5 may play a role in retrograde Golgi–ER

transport of ERD2. This was not a general effect on Golgi proteins, since the standard Golgi marker ManI–GFP was still Golgi localized under the same conditions (Fig. 14G–I). Interestingly, this effect was not observed when we used an RFP–p24δ5 mutant lacking the KK motif at the C-terminus, which is necessary for interaction with the COPI coat and therefore for retrograde Golgi–ER transport of p24δ5 (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012). Under these conditions, RFP–p24δ5(ΔKK) and ERD2–YFP extensively

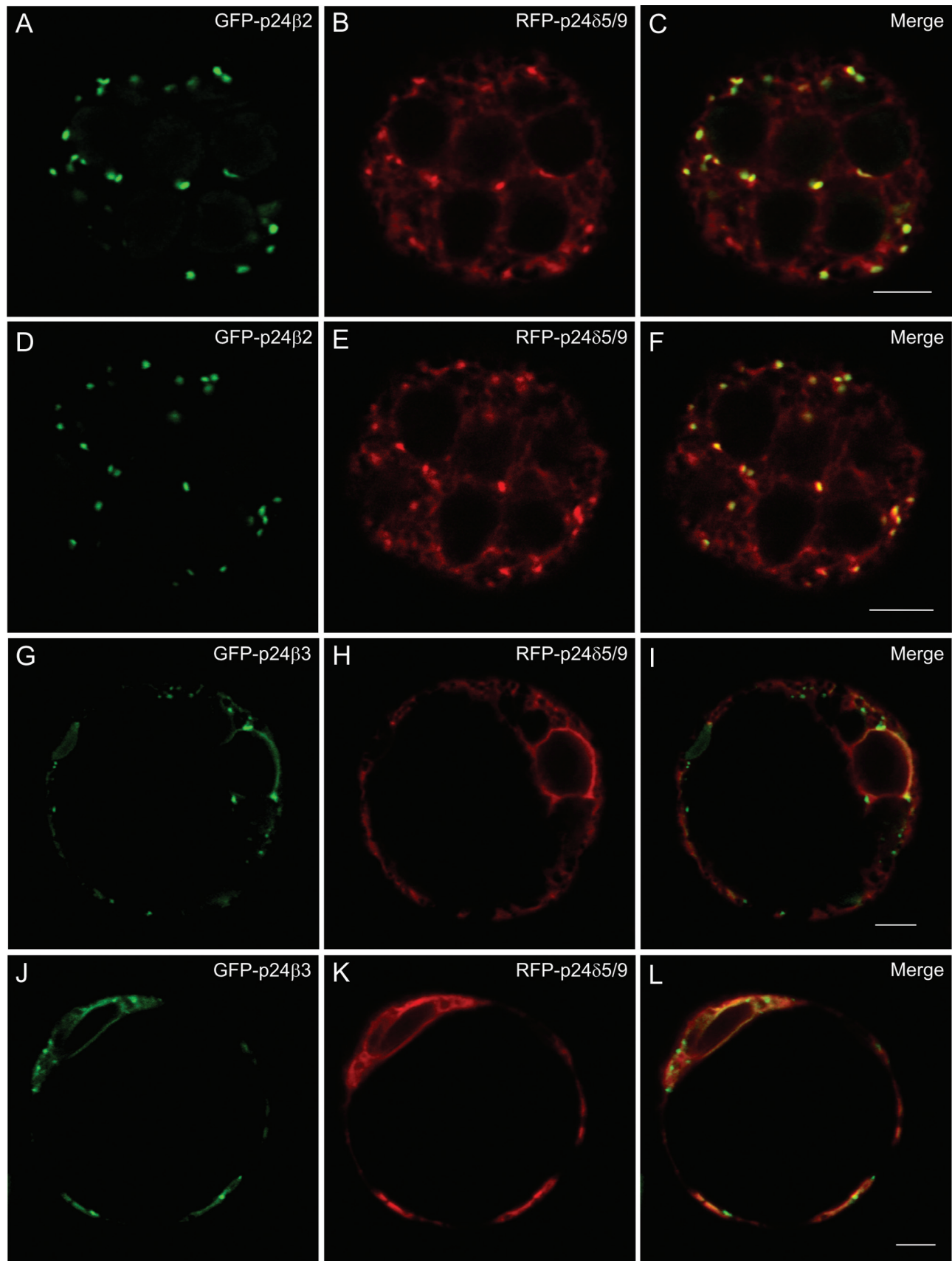


Fig. 10. Co-expression of p24 proteins of the beta and delta subfamilies (III). (A–L) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–F) GFP–p24 β 2 (A, D) and RFP–p24 δ 5/ δ 9 (B, E) co-localize extensively in punctate structures (merged images in C and F). (G–L) GFP–p24 β 3 (G, J) relocates partially to the ER, where it co-localizes with RFP–p24 δ 5/ δ 9 (H, K) (merged images in I and L). Scale bars=5 μ m.

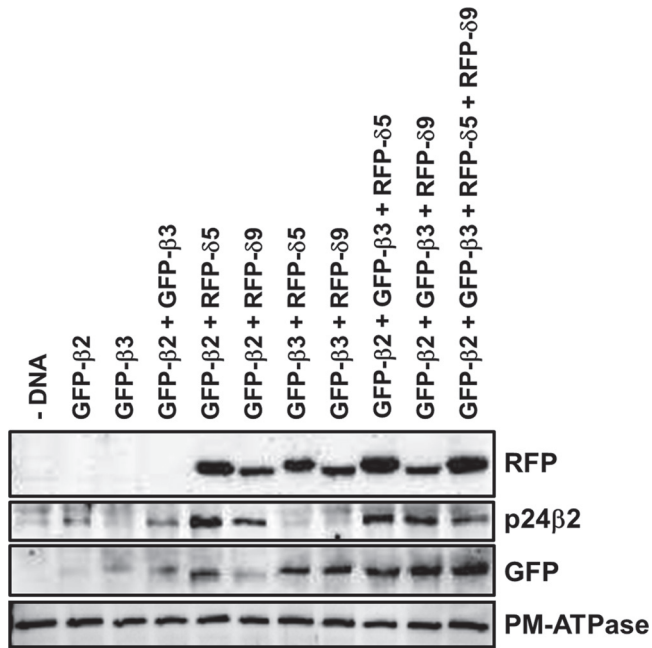


Fig. 11. Biochemical analysis of co-expression experiments. Tobacco mesophyll protoplasts were electroporated in the absence (–DNA) or the presence of 25 µg of the indicated plasmid DNAs. At 24 h post-electroporation, protoplasts were washed and homogenized to obtain a post-nuclear supernatant, which was then centrifuged to obtain a total membrane fraction. Membranes were extracted in Laemmli sample buffer and analysed by SDS–PAGE (12% acrylamide) and western blot analysis with antibodies against RFP (to detect RFP–p24δ5 and RFP–p24δ9), the p24β2 C-terminus, or GFP (to quantify the amount of both GFP–p24β2 and GFP–p24β3). A 30 µg aliquot of protein was loaded for each of the extracts. Western blot with an antibody against the plasma membrane (PM) ATPase was used as a loading control.

co-localized in punctate structures (Fig. 14D–F), which, based on previous results with this mutant, should correspond either to the Golgi or to the pre-vacuolar compartment (PVC) (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012). In addition, RFP–p24δ5(ΔKK) (but not ERD2–YFP) was also localized to the vacuole, as has been shown previously (Langhans *et al.*, 2008).

Discussion

p24 proteins have been known for quite some time, and numerous reports have been published on mammals and yeast concerning their trafficking and localization. However, only recently have their putative functions been addressed, and these appear to be highly dependent on their trafficking properties. In this respect, Hasegawa *et al.* (2010) highlighted the differential functional properties of p24 proteins from the alpha and delta subfamilies (both containing a dilysine motif in their cytoplasmic C-terminus) and the beta and gamma subfamilies. Comparatively, much less is known about these proteins in plants, which strikingly contain only members of the beta and delta subfamilies. Although *Arabidopsis* p24 proteins cycle in the early secretory pathway, their steady-state distribution appears to be different for members of the p24δ and p24β subfamilies. While endogenous p24δ5 or p24δ4 (Montesinos *et al.*, 2012) and p24δ9 (Fig. 2) localize mainly to the ER, but also partially to the *cis*-Golgi, endogenous p24β2 (Montesinos *et al.*, 2012) and p24β3 (Fig. 2) mainly localize to the Golgi, with only occasional ER labelling. This steady-state distribution may reflect the differential ability of their cytoplasmic tails to interact with COPI or COPII subunits (Contreras *et al.*, 2004a, b; Langhans *et al.*, 2008) as well as their intrinsic ability to interact with other p24 family members (Montesinos *et al.*, 2012).

Table 2. Levels of p24β2 and p24β3 in co-expression experiments

Expression conditions	Intensity (arbitrary units)		
	p24β2	GFP	p24β3
–DNA	0.0	0.0	0.0
p24β2	6.8	6.9	0.1
p24β3	0.3	11.0	10.7
p24β2+p24β3	7.0	17.0	10.0
p24β2+p24δ5	27.0	27.2	0.2
p24β2+p24δ9	12.0	12.1	0.1
p24β3+p24δ5	0.5	17.0	16.5
p24β3+p24δ9	0.3	24.0	23.7
p24β2+p24β3+p24δ5	18.0	34.1	16.1
p24β2+p24β3+p24δ9	16.0	36.2	20.2
p24β2+p24β3+p24δ5+p24δ9	12.1	52.8	40.7

Quantification of western blots from two different co-expression experiments like the one shown in Fig. 11, using the Quantity One software (Bio-Rad Laboratories). The amount of p24β3 was calculated as the difference between the intensity of GFP (which includes the signal of both GFP–p24β2 and GFP–p24β3) and that of p24β2. Western blots in the linear range of detection that showed comparable intensities for p24β2 and GFP in the co-expression of p24β2+p24δ5 and p24β2+p24δ9 were selected.

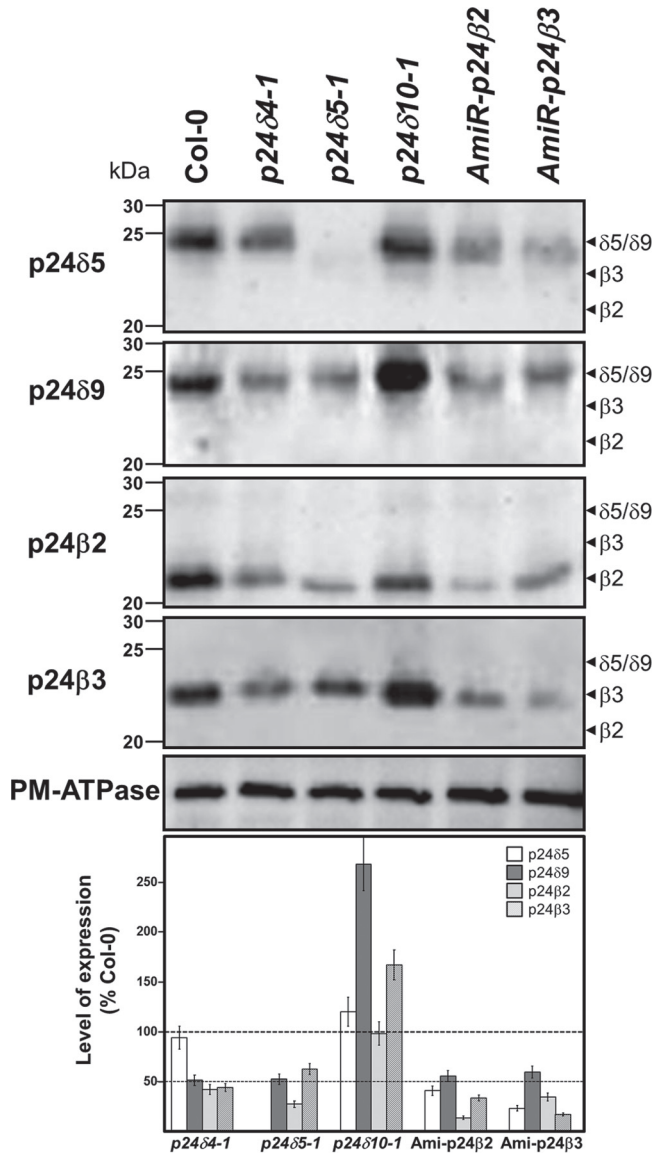


Fig. 12. Levels of p24 proteins in knock-out (KO) mutants or amiRNA lines. Western blot analysis with antibodies against the N-terminus of p24 δ 5, p24 δ 9, or p24 β 3, or the C-terminus of p24 β 2 in membranes from the wild type (Col-0) or the indicated KO mutants or amiRNA lines (see text for details). The expected positions for p24 δ 5/ δ 9, p24 β 3, and p24 β 2 (according to the western blot analysis shown in Fig. 1) are shown by arrowheads. Molecular weight markers are indicated on the left. A 25 μ g aliquot of protein was loaded in each lane. Western blotting with an antibody against the plasma membrane (PM) ATPase was used as a loading control. Lower panel shows a quantification of the levels of each of the proteins in each mutant calculated as a percentage of the levels present in wild-type (Col-0) membranes (mean \pm SD from three independent experiments).

Exit of p24 proteins from the ER appears to be COPII dependent (Fig. 5; Langhans *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012) while Golgi-ER recycling of p24 δ proteins is COPI dependent (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012). Interestingly,

ER exit of p24 β 2 and p24 β 3 appears to show some striking differences. Upon Sec12 overexpression, which titrates cytosolic Sar1p and prevents COPII-coated vesicle formation (Philipson *et al.*, 2001), both p24 β 2 and p24 β 3 showed a typical ER pattern and co-localized with a standard Golgi marker, suggesting that their ER exit is indeed COPII dependent. However, in the case of p24 β 3, an additional punctate pattern was also found. One possible explanation is that cycling of p24 β 3 occurs with slower kinetics. In this scenario, a population of the protein which has already reached the Golgi apparatus but has not been recycled would be insensitive to Sec12 treatment. However, most of the punctae where p24 β 3 was found under these conditions appear to correspond to ERES, as suggested by their co-localization with the ERES/COPII marker 6kDa VP-CFP. This differential behaviour has never been shown for p24 proteins. However, there is a previous report showing that the ER export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 (Dong *et al.*, 2008). In that study, the cell surface expression of the adrenergic receptors (ARs) α _{2B}-AR or β ₂-AR and the angiotensin 1 receptor (AT1R) were significantly attenuated by the GTP-bound mutant Sar1H79G, suggesting that ER export of these receptors occurs via Sar1-dependent COPII-coated vesicles. Interestingly, subcellular distribution analyses showed that α _{2B}-AR and AT1R receptor were highly concentrated at discrete locations near the nucleus in cells expressing Sar1H79G (presumably ERES), whereas β ₂-AR exhibited an ER distribution. These data indicate that Sar1-catalysed efficient GTP-hydrolysis differentially regulates ER export of ARs and AT1R and provided the first evidence indicating distinct mechanisms for the recruitment of different GPCRs into COPII vesicles on the ER membrane (Dong *et al.*, 2008). Further work will be necessary to elucidate whether the differential behaviour of p24 β 2 and p24 β 3 in ER export may have any functional implications.

The stability of p24 proteins, which may be related to their trafficking, has also been investigated. While p24 proteins of the delta subfamily appear to be relatively stable, when expressed either alone or in combination with other p24 family members, p24 proteins of the beta subfamily seem to depend on the interaction with other p24 family members for stabilization. Therefore, the mechanism(s) involved in their degradation have been investigated. To the authors' knowledge, there is only one previous study dealing with the mechanism of degradation of p24 proteins. In particular, TMP21 (also named p23, p24 δ subfamily), a member of the presenilin complex, has been shown to have a short half-life of \sim 3 h and to be degraded by the ubiquitin-proteasome pathway: while treatment with the proteasomal inhibitor MG-132 caused a significant increase in TMP21 protein levels, lysosomal inhibition was without effect (Liu *et al.*, 2008). To the authors' knowledge, there are no reports dealing with the degradation of p24 proteins of the beta subfamily. It has been shown that p24 β 2 localizes to the Golgi at steady state, but cycles between the ER and Golgi and may also be transported to the PVC and to the vacuole, which may result in an increased degradation by cysteine proteases present in these compartments (Montesinos *et al.*, 2012). In this study, the protein levels of

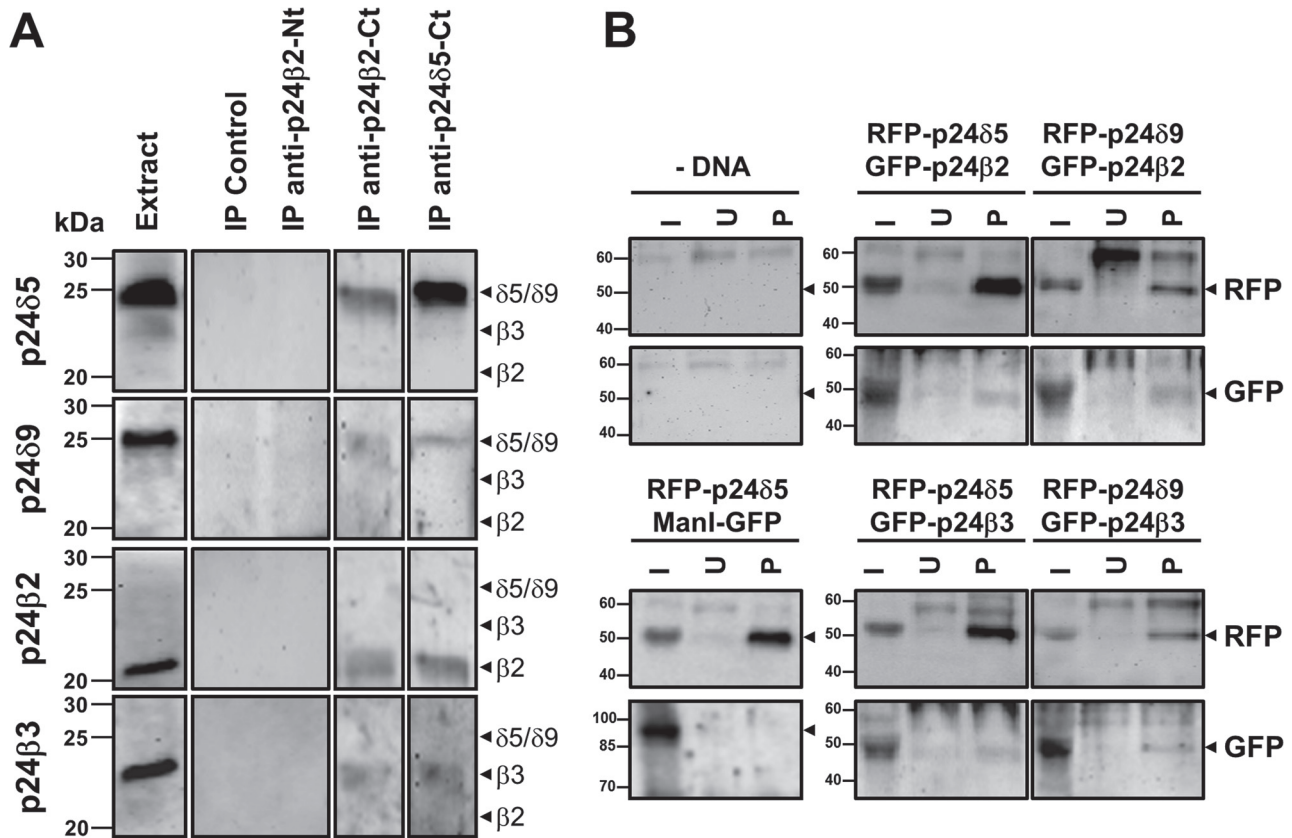


Fig. 13. Interactions between p24 proteins. (A) Co-immunoprecipitation experiments. Immunoprecipitation of endogenous p24 proteins was performed using affinity-purified antibodies against the C-terminus of p24β2 (IP anti-p24β2-Ct) or p24δ5 (IP anti-p24δ5-Ct). As a control, control beads (IP Control) or antibodies against the N-terminus of p24β2 (IP anti-p24β2-Nt) were used. Immunoprecipitates were analysed by SDS-PAGE and western blot with antibodies against the N-terminus of p24δ5, p24δ9, and p24β3, or the C-terminus of p24β2. Extract lane contains 20 μg of the membrane proteins used as input for the immunoprecipitation. The expected positions for p24δ5/δ9, p24β3, and p24β2 (according to the western blot analysis shown in Fig. 1) are shown by arrowheads. Molecular weight markers are indicated on the left. (B) Pull-down assays of RFP-p24δ5 or RFP-p24δ9 from membranes of protoplasts co-expressing the indicated proteins using an RFP-trap (see text). As a control, pull-downs were performed from membranes of untransfected protoplasts (-DNA) or protoplasts co-expressing RFP-p24δ5 and Man1-GFP. Bound proteins were analysed by SDS-PAGE and western blotting with antibodies against RFP (to detect RFP-p24δ5 or RFP-p24δ9) or GFP (to detect GFP-p24β2, GFP-p24β3, or Man1-GFP). In the case of protoplasts co-expressing RFP-p24δ5 and Man1-GFP, no RFP signal was detected in the 90kDa region (expected position for Man1-GFP) and no GFP signal was detected in the 50kDa region (expected position for RFP-p24δ5) (data not shown). I, input (5% of the membrane extracts used for the pull-down assay); U, unspecific binding (proteins bound to control blocked magnetic particles); P, pull-down.

p24β2 and p24β3 were examined and they were found to be insensitive to MG-132 treatment, under conditions that have been shown to inhibit proteasome-mediated degradation in plant cells (Yanagawa *et al.*, 2002). In contrast, treatment with the E-64, an inhibitor of cysteine proteases, caused a significant increase in the protein levels of both p24β2 and p24β3. This suggests that both proteins may be degraded by cysteine proteases upon transport to post-Golgi compartments (PVC, vacuole).

Proteins of the p24 family have been proposed to form functional heteromeric complexes, whereas it is still debatable whether they can exist as monomers, heterodimers, or heterotetramers, depending on their subcellular localization (Marzioch *et al.*, 1999; Jenne *et al.*, 2002). Recent data suggest that members of the four subfamilies in mammals (p25,

p24, p28, and p23) can form hetero-oligomers, although the stoichiometry among them remains to be determined (Fujita *et al.*, 2011). Plants contain only p24 proteins of the beta and delta subfamilies, the latter containing members of two different subclasses (δ1 and δ2) (Chen and Zheng, 2012). Interestingly, western blot analysis of the different mutants that have been analysed shows that the lack of a member of the δ1 subclass causes a reduction in the protein levels of members of the δ2 subclass but not of members of the δ1 subclass. In this respect, the *p24δ5-1* mutant shows no change in the levels of p24δ4 and vice versa (Montesinos *et al.*, 2012), but reduced levels of p24δ9. In addition, p24δ1 mutants (*p24δ5-1* and *p24δ4-1*) showed reduced protein levels of both p24β2 and p24β3. On the other hand, the *p24δ10-1* mutant that lacks p24δ10 (δ2 subclass) showed increased

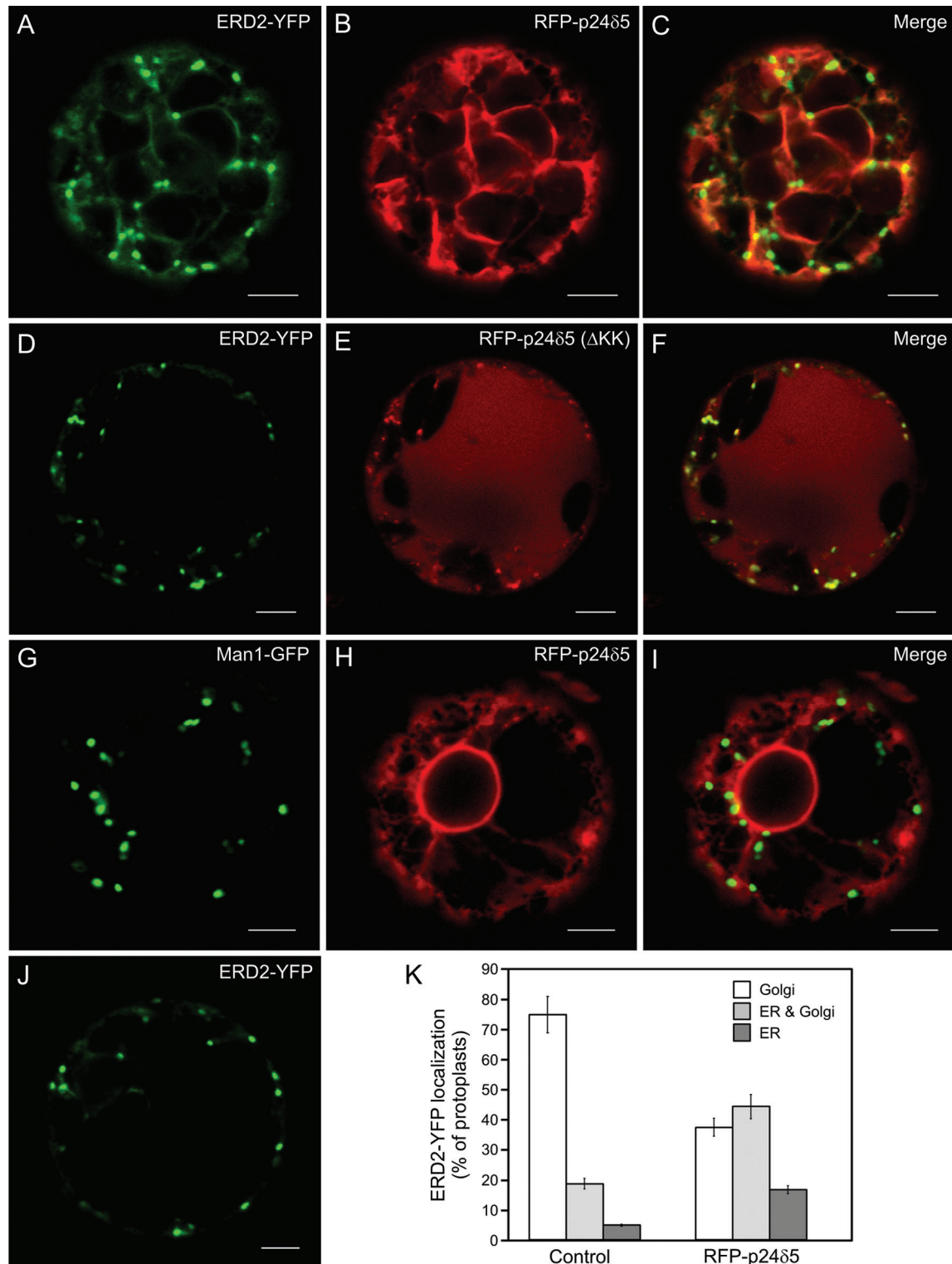


Fig. 14. RFP-p24δ5 [but not RFP-p24δ5(ΔKK)] partially relocalizes ERD2-YFP to the ER. (A–J) Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (A–C) RFP-p24δ5 (B) caused a partial relocalization of ERD2-YFP (A) to the ER, although ERD2-YFP also showed a punctate localization (ER and Golgi localization) (merged image in C). (D–F) ERD2-YFP (D) and RFP-p24δ5(ΔKK) (E) (which also shows vacuolar localization) almost completely co-localized in punctate structures (merged image in F). (G–I) RFP-p24δ5 (H) did not significantly change the localization of Man1-GFP (G) (merged image in I). (J) ERD2-YFP showed mostly a Golgi localization when expressed alone. (K) Quantification of the localization of ERD2-YFP expressed alone (Control) or in the presence of RFP-p24δ5. Eighty protoplasts (from four independent experiments), showing comparable expression levels of ERD2-YFP, Man1-GFP, and RFP-p24δ5, were analysed per condition, using identical laser output levels and imaging conditions. The localization of ERD2-YFP was assigned as Golgi (punctae), ER and Golgi, or ER, and calculated as a percentage. Error bars represent the SEM. Images in the panels show the most representative pattern found for each condition. Scale bars=5 μm.

protein levels of the closely related p24 δ 9 (δ 2 subclass), probably induced in the absence of p24 δ 10, and no decrease in the levels of p24 δ 5 (δ 1 subclass) or p24 β proteins. This indicates that the increased protein levels of p24 δ 9 may compensate for the lack of p24 δ 10 in the *p24 δ 10* mutant. On the other hand, amiRNA lines with reduced levels of p24 β 2 or p24 β 3 showed reduced protein levels of p24 β 3 or p24 β 2 (respectively) and of p24 δ proteins from both subclasses. Altogether, these results suggest that p24 proteins may form heteromeric complexes containing members of the delta and beta subfamilies. This is consistent with the co-immunoprecipitation and pull-down experiments, which suggest that members of the beta and delta subfamilies interact with each other.

The co-expression experiments further support the existence of interactions between p24 proteins from both subfamilies and their coupled transport in the early secretory pathway. This can be deduced from the strong co-localization between p24 β 2 and p24 δ 5 or p24 δ 9, as well as by the fact that p24 β 2 changes the localization of p24 δ 5 and/or p24 δ 9 from a typical ER pattern to punctate structures corresponding to both pre-Golgi COPII (Langhans *et al.*, 2012) and Golgi. This indicates that p24 β 2 is able to facilitate the transport of p24 δ 5 and p24 δ 9 from the ER to the Golgi. In addition, the stability of p24 β 2 increases significantly when co-expressed with p24 δ 5 or p24 δ 9 (Table 2). This is probably because p24 δ proteins may hold back p24 β proteins in the early secretory pathway (Montesinos *et al.*, 2012). In the case of p24 δ 5 and p24 β 2, these effects require the coiled-coil domain, which suggests they are mediated by a direct interaction between both proteins (Montesinos *et al.*, 2012). On the other hand, co-expression of p24 β 2 and p24 β 3 does not produce any significant stabilization of these proteins (Table 2). In contrast to p24 β 2, p24 β 3 shows only a partial co-localization with p24 δ 5 or p24 δ 9 and is also stabilized partially in the presence of these proteins. Interestingly, maximal stability of p24 β 3 was only achieved when co-expressed with both RFP-p24 δ 5 and RFP-p24 δ 9 (Table 2). The fact that p24 β 3 (but not p24 β 2) partially relocates to the ER under these conditions suggests that both RFP-p24 δ 5 and RFP-p24 δ 9 may cooperate in retrograde Golgi-ER transport of p24 β 3, contributing to its increased stability.

Altogether, the present experiments suggest that there are highly dynamic and complex interactions between p24 members of each subclass/subfamily which are needed for their correct localization and stability and therefore function. Although the stoichiometry and composition of these complexes remain to be established, the experiments described here suggest that 'anterograde' complexes should include p24 β 2, which facilitates transport of both p24 δ 5 (δ 1 subclass) and p24 δ 9 (δ 2 subclass) to the Golgi apparatus. On the other hand, 'retrograde' complexes should contain p24 δ proteins (for sorting into COPI vesicles), probably including members from the δ 1 and δ 2 subclasses.

As a first attempt to elucidate putative functions for *Arabidopsis* p24 proteins, a gain-of-function approach has been used, given the lack of phenotypic alterations found in single knock-out mutants or knock-down lines. These experiments have convincingly shown that p24 δ 5 appears to play a role in the retrograde Golgi-ER transport of the KDEL-receptor

ERD2, probably by facilitating its sorting into COPI vesicles. Indeed, ERD2-mediated retrograde transport of cholera toxin (a KDEL cargo) from the Golgi back to the ER has been shown to involve COPI, mammalian p23 (p24 δ subfamily), and ERD2 (Majoul *et al.*, 1998). In addition, it has been shown that p23 interacts with ERD2, suggesting that p23 participates directly in the retrograde transport of ERD2 (Majoul *et al.*, 2001). The results are consistent with those observations. The fact that the C-terminus of p24 δ 5 has a high affinity for COPI (Contreras *et al.*, 2004a, b) makes this protein (and probably other members of the delta subfamily) ideal to perform a similar role in retrograde Golgi-ER transport in plants.

Supplementary data

Supplementary data are available at *JXB* online.

Figure S1. The p24 family in *Arabidopsis*.

Figure S2. Western blot analysis with Nt-p24 antibodies of bacterial extracts expressing (His)₆-tagged N-terminal p24 constructs.

Figure S3. Localization of RFP-p24 δ 9.

Figure S4. Localization of YFP-p24 β 2.

Figure S5. Co-expression of CFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 9 in tobacco leaf epidermal cells.

Figure S6. Characterization of the *p24 δ 10* mutant and amiRNA-p24 β 2 and amiRNA-p24 β 3 lines.

Acknowledgements

We thank the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory for providing the sequence-indexed *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants, the greenhouse and electron microscopy sections of SCSIE (University of Valencia), and Pilar Selvi and Barbara Jesenofsky for excellent technical assistance. This work was supported by the Ministerio de Ciencia e Innovación (grant no. BFU2009-07039 to FA), Generalitat Valenciana (grant no. ISIC/2013/004 to FA) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant no. RO440/14-1 to DGR). JCM was the recipient of fellowships from Generalitat Valenciana (Geronimo Forteza Program) and from the Ministerio de Educación y Ciencia (FPU Program).

References

- Aguilera-Romero A, Kaminska J, Spang A, Riezman H, Muñoz M. 2008. The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *Journal of Cell Biology* **180**, 713–720.
- Anantharaman V, Aravind L. 2002. The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biology* **3**, research0023.
- Axelos M, Curie C, Bardet C, Lescure B. 1992. A protocol for transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* **30**, 123–128.
- Belden WJ, Barlowe C. 1996. Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 26939–26946.

- Belden WJ, Barlowe C.** 2001. Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 43040–43048.
- Brandizzi F, Frangne N, Marc-Martin S, Hawes C, Neuhaus JM, Paris N.** 2002. The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *The Plant Cell* **14**, 1077–1092.
- Bubeck J, Scheuring D, Hummel E, Langhans M, Viotti C, Foresti O, Denecke J, Banfield DK, Robinson DG.** 2008. The syntaxins SYP31 and SYP81 control ER–Golgi trafficking in the plant secretory pathway. *Traffic* **9**, 1629–1652.
- Carney GE, Bowen NJ.** 2004. p24 proteins, intracellular trafficking, and behaviour: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biology of the Cell* **96**, 271–278.
- Castillon GA, Aguilera-Romero A, Manzano-Lopez J, Epstein S, Kajiwara K, Funato K, Watanabe R, Riezman H, Muñoz M.** 2011. The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 2924–2936.
- Chen F, Hasegawa H, Schmitt-Ulms G, et al.** 2006. TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* **440**, 1208–1212.
- Chen J, Qi X, Zheng H.** 2012. Subclass-specific localization and trafficking of Arabidopsis p24 proteins in the ER–Golgi interface. *Traffic* **13**, 400–415.
- Ciufo LF, Boyd A.** 2000. Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 8382–8388.
- Clough SJ, Bent AF.** 1998. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **16**, 735–743.
- Contreras I, Ortiz-Zapater E, Aniento F.** 2004a. Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant ARF1 and coatomer. *The Plant Journal* **38**, 685–698.
- Contreras I, Yang Y, Robinson DG, Aniento F.** 2004b. Plant COPI and COPII coat proteins show a differential affinity for p24 cytosolic tails. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1779–1786.
- Contreras FX, Ernst AM, Haberkant P, et al.** 2012. Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. *Nature* **481**, 525–529.
- Dancourt J, Barlowe C.** 2010. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annual Review of Biochemistry* **79**, 777–802.
- Denzel A, Otto F, Girod A, Pepperkok R, Watson R, Rosewell I, Bergeron JJ, Solari RC, Owen MJ.** 2000. The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Current Biology* **10**, 55–58.
- Dominguez M, Dejgaard K, Fullekrug J, Dahan S, Fazel A, Paccaud JP, Thomas DY, Bergeron JJ, Nilsson T.** 1998. gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COPI and COPII coatomer. *Journal of Cell Biology* **140**, 751–765.
- Dong C, Zhou F, Fugetta EK, Filipeanu CM, Wu G.** 2008. Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase. *Cellular Signalling* **20**, 1035–1043.
- Emery G, Rojo M, Gruenberg J.** 2000. Coupled transport of p24 family members. *Journal of Cell Science* **113**, 2507–2516.
- French AP, Mills S, Swarup R, Bennett MJ, Pridmore TP.** 2008. Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nature Protocols* **3**, 619–628.
- Fujita M, Watanabe R, Jaensch N, Romanova-Michaelides M, Satoh T, Kato M, Riezman H, Yamaguchi Y, Maeda Y, Kinoshita T.** 2011. Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI. *Journal of Cell Biology* **194**, 61–75.
- Füllerkrug J, Suganuma T, Tang BL, Hong W, Storrer B, Nilsson T.** 1999. Localization and recycling of gp27 (hp24g3): complex formation with other p24 family members. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1939–1955.
- Gommel D, Orci L, Emig EM, Hannah MJ, Ravazzola M, Nickel W, Helms JB, Wieland FT, Sohn K.** 1999. p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between organelles of the early secretory pathway. *FEBS Letters* **447**, 179–185.
- Hasegawa H, Liu L, Nishimura M.** 2010. Dilysin retrieval signal-containing p24 proteins collaborate in inhibiting γ -cleavage of amyloid precursor protein. *Journal of Neurochemistry* **115**, 771–781.
- Jenne N, Frey K, Brügger B, Wieland FT.** 2002. Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 46504–46511.
- Jerome-Majewska LA, Achkar T, Luo L, Lupu F, Lacy E.** 2010. The trafficking protein Tmed2/p24beta(1) is required for morphogenesis of the mouse embryo and placenta. *Developmental Biology* **341**, 154–166.
- Koehler E, Bonnon C, Waldmeier L, Mitrovic S, Halbeisen R, Hauri HP.** 2010. p28, a novel ERGIC/cis Golgi protein, required for Golgi ribbon formation. *Traffic* **11**, 70–89.
- Langhans M, Marcote MJ, Pimpl P, Virgili-López G, Robinson DG, Aniento F.** 2008. *In vivo* trafficking and localization of p24 proteins in plant cells. *Traffic* **9**, 770–785.
- Langhans M, Meckel T, Kress A, Lerich A, Robinson DG.** 2012. ERES (ER exit sites) and the 'secretory unit concept'. *Journal of Microscopy* **247**, 48–59.
- Lavoie C, Paiement J, Dominguez M, Roy L, Dahan S, Gushue JN, Bergeron JJ.** 1999. Roles for alpha(2)p24 and COPI in endoplasmic reticulum cargo exit site formation. *Journal of Cell Biology* **146**, 285–300.
- Lee MH, Min MK, Lee YJ, Jin JB, Shin DH, Kim DH, Lee KH, Hwang I.** 2002. ADP-ribosylation factor 1 of Arabidopsis plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 1507–20.
- Lerich A, Langhans M, Sturm S, Robinson DG.** 2011. Is the 6kDa tobacco etch viral protein a bona fide ERES marker? *Journal of Experimental Botany* **62**, 5013–5023.
- Liu S, Bromley-Brits K, Xia K, Mittelholtz J, Wang R, Song W.** 2008. TMP21 degradation is mediated by the ubiquitin–proteasome pathway. *European Journal of Neuroscience* **28**, 1980–1988.
- Luo W, Wang Y, Reiser G.** 2007. p24A, a type I transmembrane protein, controls ARF1-dependent resensitization of

- protease-activated receptor-2 by influence on receptor trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 30246–30255.
- Luo W, Wang Y, Reiser G.** 2011. Proteinase-activated receptors, nucleotide P2Y receptors, and μ -opioid receptor-1B are under the control of the type I transmembrane proteins p23 and p24A in post-Golgi trafficking. *Journal of Neurochemistry* **117**, 71–81.
- Majoul I, Sohn K, Wieland FT, Pepperkok R, Pizza M, Hillemann J, Söling HD.** 1998. KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *Journal of Cell Biology* **143**, 601–612.
- Majoul I, Straub M, Hell SW, Duden R, Söling HD.** 2001. KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Developmental Cell* **1**, 139–153.
- Marzioch M, Henthorn DC, Herrmann JM, Wilson R, Thomas DY, Bergeron JJ, Solari RC, Rowley A.** 1999. Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 1923–1938.
- Mitrovic S, Ben-Tekaya H, Koegler E, Gruenberg J, Hauri HP.** 2008. The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum–Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 1976–1990.
- Montesinos JC, Sturm S, Langhans M, Hillmer S, Marcote MJ, Robinson DG, Aniento F.** 2012. Coupled transport of Arabidopsis p24 proteins at the ER–Golgi interface. *Journal of Experimental Botany* **63**, 4243–4261.
- Muñiz M, Nuoffer C, Hauri HP, Riezman H.** 2000. The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *Journal of Cell Biology* **148**, 925–930.
- Nebenführ A, Frohlich JA, Staehelin LA.** 2000. Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiology* **124**, 135–151.
- Nebenführ A, Gallagher LA, Dunahay TG, Frohlich JA, Mazurkiewicz AM, Meehl JB, Staehelin LA.** 1999. Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiology* **121**, 1127–1142.
- Ortiz-Masia D, Perez-Amador MA, Carbonell J, Marcote MJ.** 2007. Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of Arabidopsis. *FEBS Letters* **581**, 1834–1840.
- Ortiz-Zapater E, Soriano-Ortega E, Marcote MJ, Ortiz-Masiá D, Aniento F.** 2006. Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. *The Plant Journal* **48**, 757–770.
- Ossowski S, Schwab R, Weigel D.** 2008. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* **53**, 674–690.
- Phillipson BA, Pimpl P, daSilva LL, Crofts AJ, Taylor JP, Movafeghi A, Robinson DG, Denecke J.** 2001. Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *The Plant Cell* **13**, 2005–2020.
- Pimpl P, Hanton SL, Taylor JP, Pinto-DaSilva LL, Denecke J.** 2003. The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *The Plant Cell* **15**, 1242–1256.
- Rojo M, Emery G, Marjomäki V, McDowall A, Parton RG, Gruenberg J.** 2000. The transmembrane protein p23 contributes to the organization of the Golgi apparatus. *Journal of Cell Science* **113**, 1043–1057.
- Schimmöller F, Singer-Krüger B, Schröder S, Krüger U, Barlowe C, Riezman H.** 1995. The absence of Em24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO Journal* **14**, 1329–1339.
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D.** 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell* **18**, 1121–1133.
- Strating JR, Martens GJ.** 2009. The p24 family and selective transport processes at the ER–Golgi interface. *Biology of the Cell* **101**, 495–509.
- Strating JR, van Bakel NH, Leunissen JA, Martens GJ.** 2009. A comprehensive overview of the vertebrate p24 family: identification of a novel tissue-specifically expressed member. *Molecular Biology and Evolution* **26**, 1707–1714.
- Takida S, Maeda Y, Kinoshita T.** 2008. Mammalian GPI-anchored proteins require p24 proteins for their efficient transport from the ER to the plasma membrane. *Biochemical Journal* **409**, 555–562.
- Vetrivel KS, Gong P, Bowen JW, et al.** 2007. Dual roles of the transmembrane protein p23/TMP21 in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *Molecular Neurodegeneration* **2**, 4.
- Wei T, Wang A.** 2008. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *Journal of Virology* **82**, 12252–12264.
- Wen C, Greenwald I.** 1999. p24 proteins and quality control of LIN-12 and GLP-1 trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Cell Biology* **145**, 1165–1175.
- Yanagawa Y, Hasezawa S, Kumagai F, et al.** 2002. Cell-cycle dependent dynamic change of 26S proteasome distribution in tobacco BY-2 cells. *Plant and Cell Physiology* **43**, 604–613.
- Zhang L, Volchuk A.** 2010. p24 family type 1 transmembrane proteins are required for insulin biosynthesis and secretion in pancreatic beta-cells. *FEBS Letters* **584**, 2298–2304.

**PUTATIVE p24 COMPLEXES IN ARABIDOPSIS CONTAIN MEMBERS OF
THE DELTA AND BETA SUBFAMILIES AND CYCLE IN THE EARLY
SECRETORY PATHWAY**

Juan Carlos Montesinos^{*1}, Markus Langhans^{2*}, Silke Sturm^{*2}, Stefan Hillmer²,
Fernando Aniento¹, David G. Robinson² and María Jesús Marcote^{1,#}

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. The p24 family in *Arabidopsis*.

Figure S2. Western-blot analysis with Nt-p24 antibodies of bacterial extracts expressing (His)₆-tagged N-terminal p24 constructs.

Figure S3. Localization of RFP-p24 δ 9.

Figure S4. Localization of YFP-p24 β 2.

Figure S5. Co-expression of CFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 9 in tobacco leaf epidermal cells.

Figure S6. Characterization of *p24 δ 10* mutant and amiRNA-p24 β 2 and amiRNA-p24 β 3 lines

Figure S1

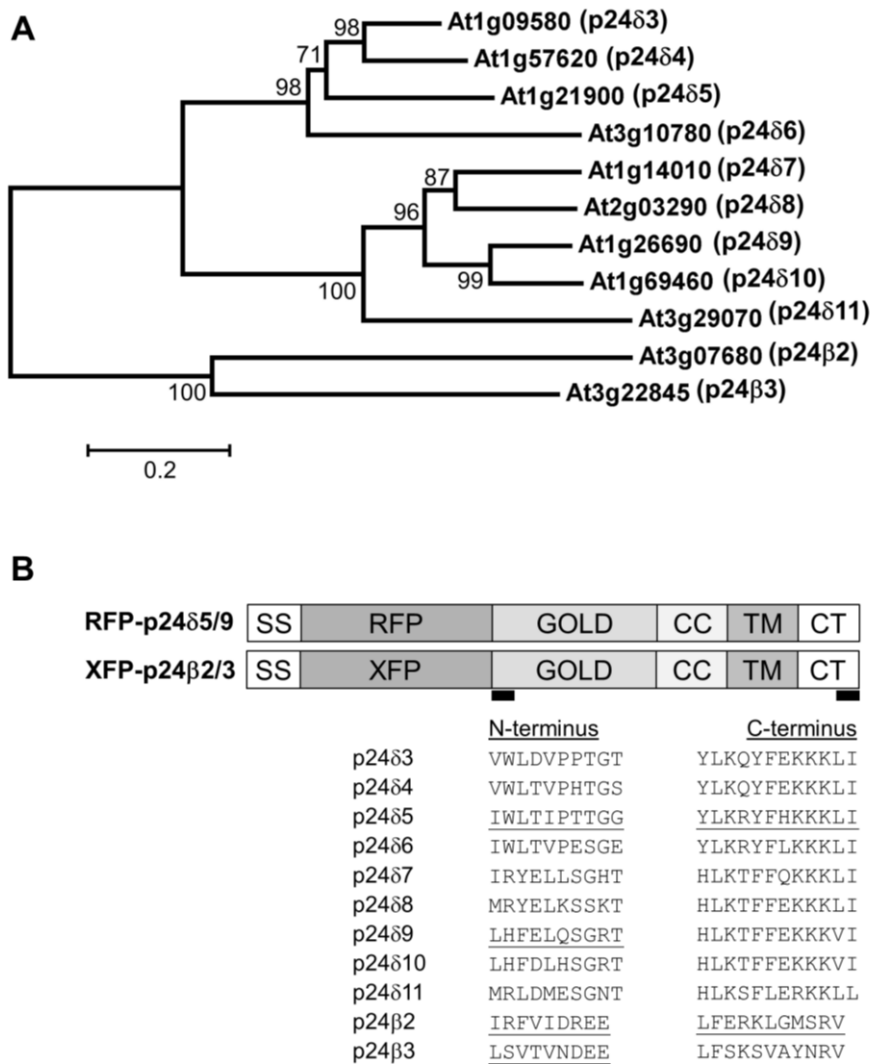


Figure S1. The p24 family in *Arabidopsis*.

A. A phylogenetic tree containing the δ and β subfamilies of p24 proteins in *Arabidopsis* (Montesinos et al., 2012). A multiple alignment of the p24 proteins was constructed using ClustalW and the tree was generated from this alignment using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software (MEGA, version 5.03) with the neighbor-joining method. The numbers beside the branches represent bootstrap percentage based on 1000 replications. The names assigned to these proteins, following the nomenclature proposed by Dominguez et al. (1998), are shown next to the AGI code.

B. Schematic representation of the RFP-p24 δ 5/9 and XFP-p24 β 2/3 constructs used in this study, including the different domains of p24 proteins. SS, signal sequence; GOLD, domain involved in Golgi Dynamics (see text for details); CC, coiled-coil domain; TM, transmembrane domain; CT, cytoplasmic tail. The position and the sequence of the N- and C-terminus of the 11 members of the p24 family in *Arabidopsis* are also shown. Sequences used to obtain peptide antibodies are underlined.

Figure S2

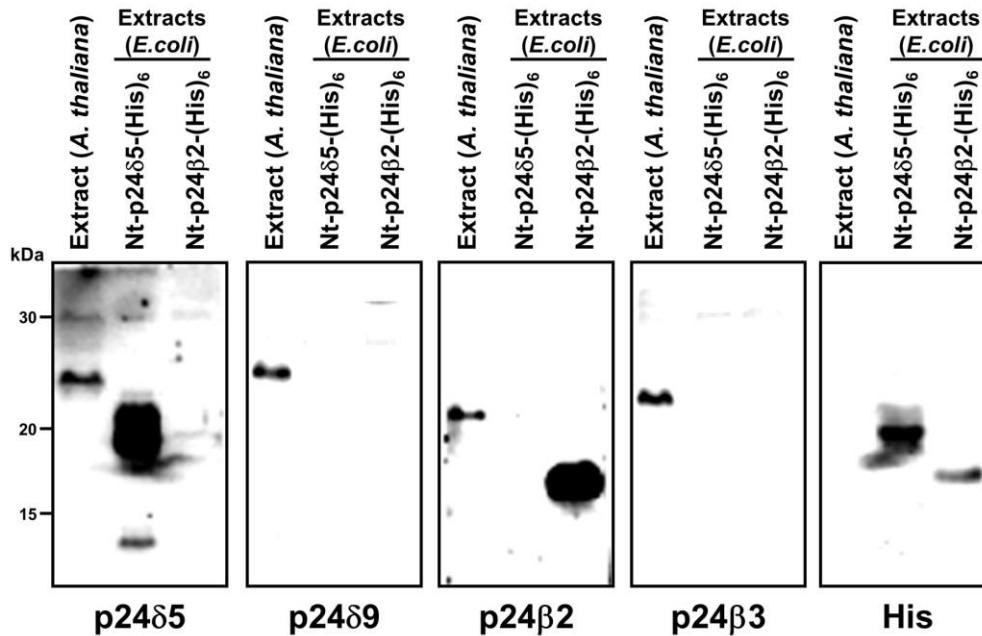


Figure S2. Western-blot analysis with Nt-p24 antibodies of bacterial extracts expressing (His)₆-tagged N-terminal p24 constructs.

The N-terminal luminal portion of p24 δ 5 and p24 β 2, with an (His)₆-tag at their C-terminus, were expressed in bacteria. Bacterial extracts were analyzed by SDS-PAGE (14 % acrylamide) and Western blotting with antibodies against the N-terminus of p24 δ 5 (Montesinos et al., 2012), p24 δ 9, p24 β 2 (Montesinos et al., 2012) or p24 β 3 or with histidine antibodies (GE Healthcare), which recognized both proteins. Note the differences in electrophoretic mobility between the cytosolic portions of p24 δ 5 and p24 β 2. As a control, we used membrane extracts from Arabidopsis cell cultures.

Figure S3

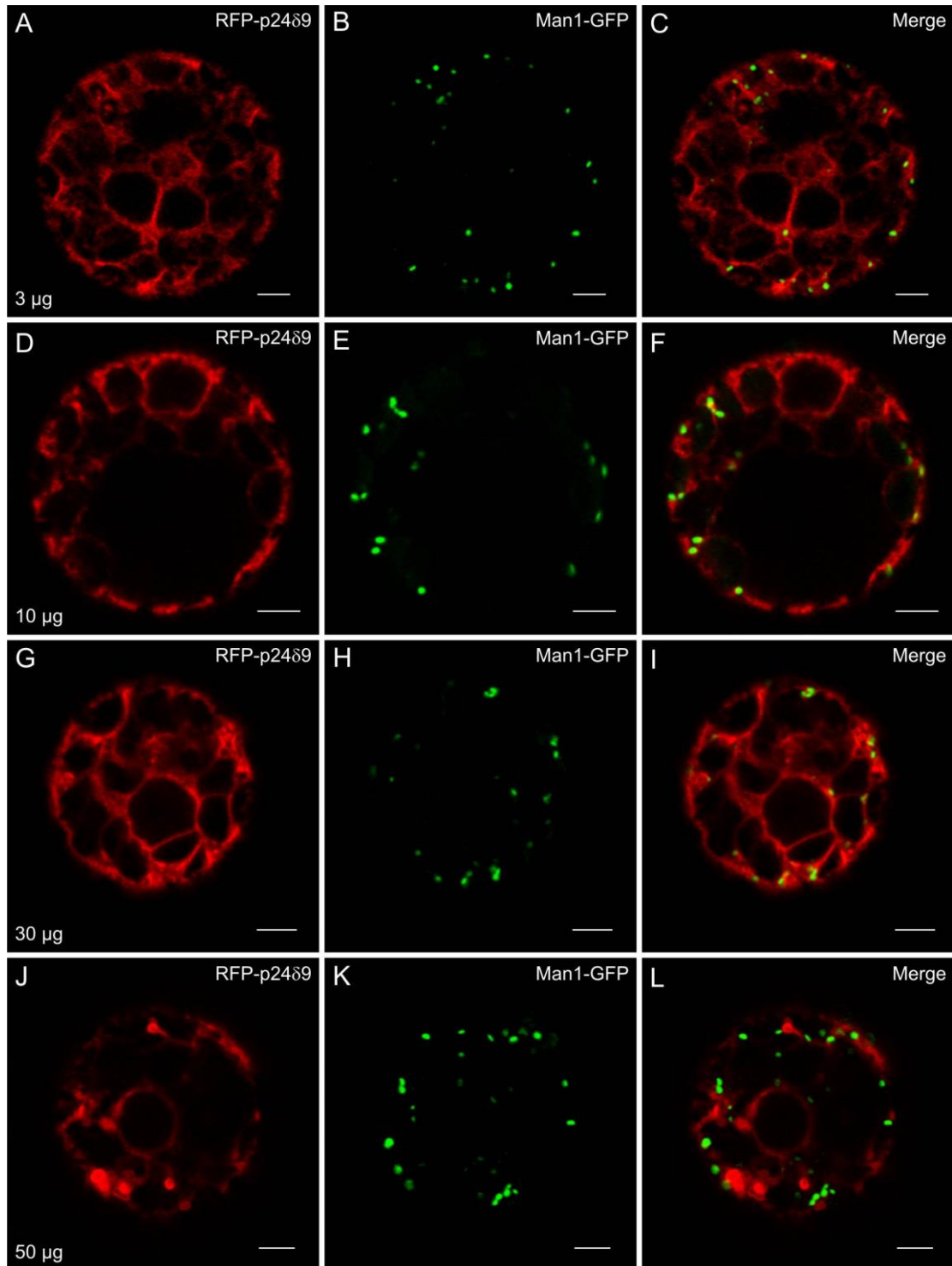


Figure S3. Localization of RFP-p24 δ 9.

A-L. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts using the indicated concentrations of DNA (from 3 to 50 μ g). RFP-p24 δ 9 (A, D, G, J) shows a typical ER pattern and shows no colocalization with the Golgi marker Man I-GFP (B, E, H, K) (merged images in C, F, I, L) at all DNA concentrations. Scale bars = 5 μ m.

Figure S4

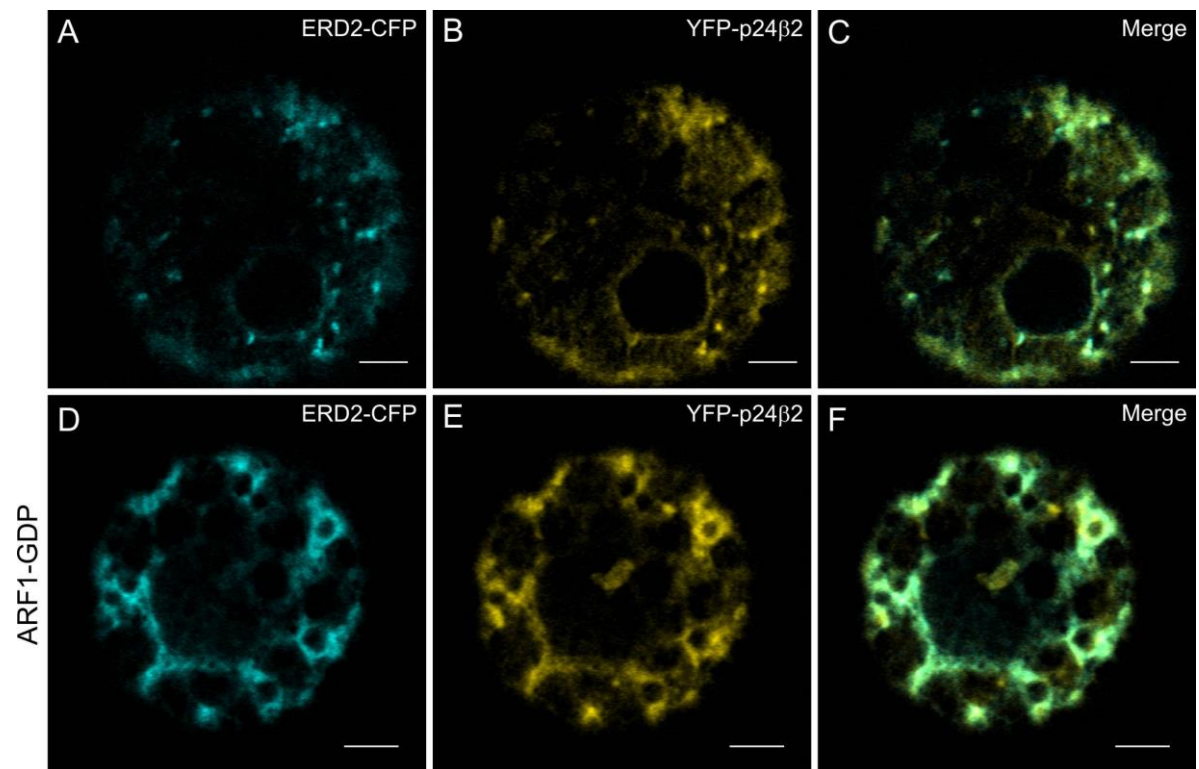


Figure S4. Localization of YFP-p24β2.

A-C. YFP-p24β2 (B) colocalizes partially with the Golgi marker ERD2-CFP (A) in punctate structures (merged image in C). D-F. YFP-p24β2 (E) and ERD2-CFP (D) relocalized to the ER upon co-expression with the ARF1-GDP mutant (merged image in F). Scale bars = 5 μm.

Figure S5

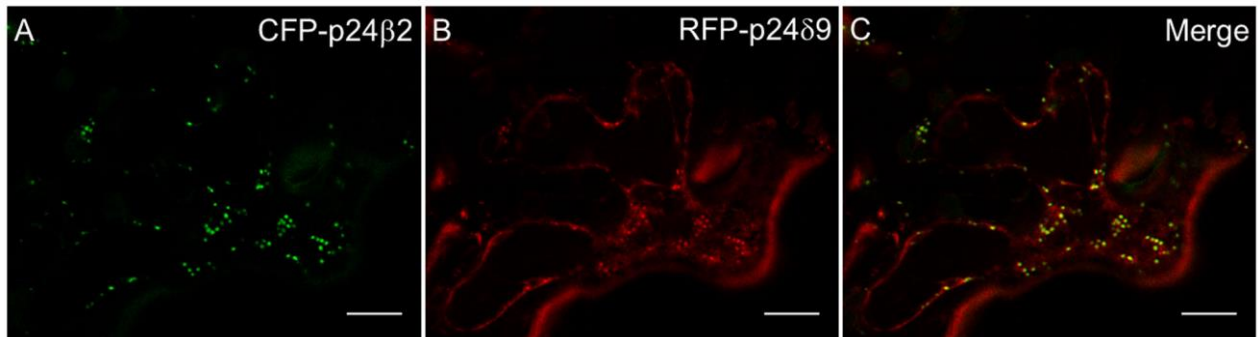


Figure S5. Co-expression of CFP-p24 β 2 and RFP-p24 δ 9 in tobacco leaf epidermal cells. Transient gene expression in tobacco leaf epidermal cells. CFP-p24 β 2 (A) colocalizes extensively with RFP-p24 δ 9 (B) in punctate structures (merged image in C). Scale bars = 10 μ m.

Figure S6

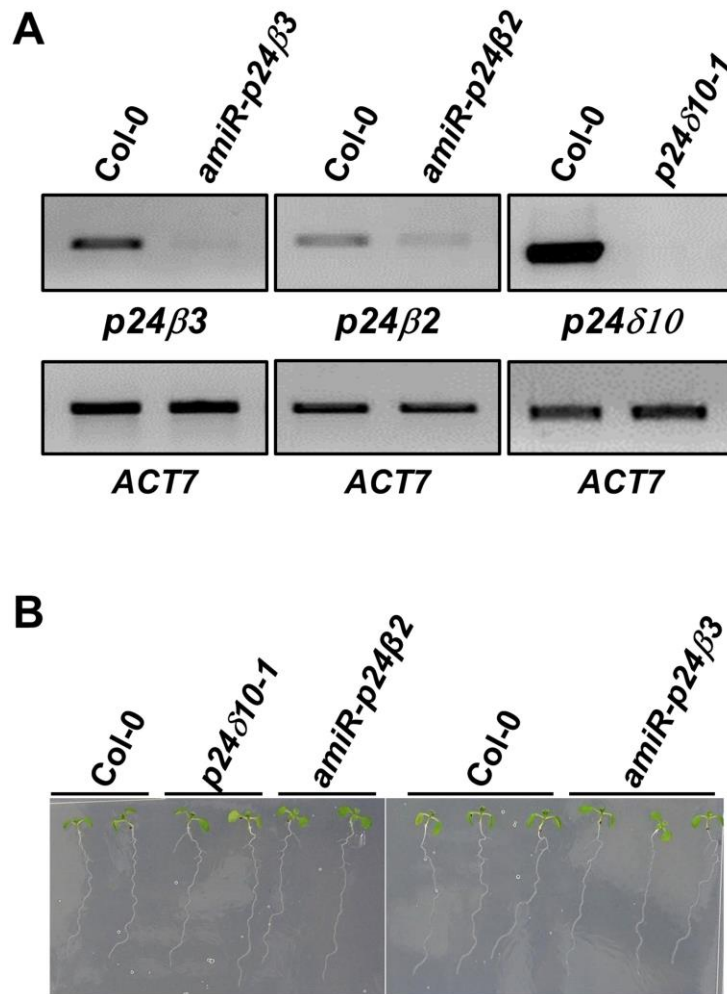


Figure S6. Characterization of *p24 δ 10* mutant and amiRNA-p24 β 2 and amiRNA-p24 β 3 lines
A. RT-PCR analysis of *p24 δ 10* knockout mutant, amiRNA β 2 (*amiR-p24 β 2*) and amiRNA β 3 (*amiR-p24 β 3*) knockdown lines. Total RNA from leaves of the mutants and wild-type plants were used for the RT-PCR. In the PCRs, gene specific primers were used. *Actin7* (*ACT7*) was used as a control.
B. *p24 δ 10*, *amiR-p24 β 2* and *amiR-p24 β 3* seedlings grown on vertical agar plates for 6 days did not show a phenotype different from that of wild-type (Col-0) plants.

ARTÍCULO 3

Arabidopsis p24 δ 5 and p24 δ 9 facilitate COPI-dependent Golgi-to-ER transport of the K/HDEL receptor ERD2

Juan Carlos Montesinos, Noelia Pastor-Cantizano, David G. Robinson,
María Jesús Marcote and Fernando Aniento

Plant Journal. 2014

doi: 10.1111/tpj.12700

***Arabidopsis* p24 δ 5 and p24 δ 9 facilitate COPI-dependent Golgi-to-ER transport of the K/HDEL receptor ERD2**

Juan Carlos Montesinos¹, Noelia Pastor-Cantizano¹, David G. Robinson², María Jesús Marcote¹ and Fernando Aniento^{1#}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Spain

²Centre for Organismal Studies, University of Heidelberg, Germany

To whom correspondence should be addressed

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia
Avenida Vicente Andrés Estellés s/n
E-46100 BURJASSOT (VALENCIA). SPAIN
Tel. + 34-963543620
Fax. +34-963544917
e-mail: Fernando.aniento@uv.es

E-mail authors: Juan.montesinos@uv.es, Noelia.Pastor@uv.es, David.Robinson@urz.uni-heidelberg.de,
Mariajesus.marcote@uv.es

Running title: Arabidopsis p24 proteins and ERD2 trafficking

Keywords: Arabidopsis thaliana, K/HDEL receptor ERD2, p24 proteins, Coat protein I (COPI), Coat Protein II (COPII), ER-Golgi transport, Golgi-to-ER transport

Total word count: 7450 (Summary, 180; Introduction, 1252; Results, 2498; Discussion, 1468; Experimental procedures, 710; Acknowledgements, 54; Figure legends, 1288).

Received Date : 12-Mar-2014

Revised Date : 02-Oct-2014

Accepted Date : 03-Oct-2014

Article type : Original Article

SUMMARY

p24 proteins belong to a family of type I membrane proteins which cycle between ER and Golgi via COPI and COPII vesicles. Current nomenclature classifies them into four subfamilies, although plant p24 proteins belong to either the p24beta or the p24delta subfamilies. Here, we show that *Arabidopsis* p24 δ 5/ δ 9 and HDEL ligands shift the steady-state distribution of the K/HDEL receptor ERD2 from the Golgi to the ER. We also show that p24 δ 5/ δ 9 interact directly with ERD2. This interaction requires the GOLD domain in p24 δ 5 and is much higher at acidic than at neutral pH, consistent with both proteins interacting at the *cis*-Golgi. In addition, p24 δ 5 also inhibits the secretion of HDEL ligands, but not constitutive secretion, showing a role of p24 δ 5 in retrograde Golgi-to-ER transport. Both p24 δ 5 and ERD2 interact with ARF1 and COPI subunits, mostly at acidic pH, consistent with COPI vesicles being involved in retrograde transport of both proteins. In contrast, both proteins interact with the COPII subunit Sec23 mostly at neutral pH, consistent with this interaction taking place at the ER for anterograde transport to the Golgi apparatus.

INTRODUCTION

ERD2 proteins belong to a family of proteins highly conserved across species. They recognize a conserved C-terminal tetrapeptide sequence (KDEL or HDEL) on ER-luminal proteins in the early Golgi that have escaped from the ER, and cycle these proteins back into the ER (Munro and Pelham, 1987; Lewis et al., 1990; Semenza et al., 1990; Lewis and Pelham, 1992; Townsley et al., 1993; Wilson et al., 1993). When functioning efficiently, ERD2 proteins scavenge ligands in the Golgi and dissociate them in the lumen of the ER. There is therefore a bidirectional traffic of this receptor between these two organelles, which is considered to entail a COPII-mediated anterograde ER-to-Golgi transport of free receptor molecules and COPI-mediated retrograde Golgi-to-ER transport of ERD2 bound to HDEL/KDEL ligands (Capitani and Sallese, 2009; Darcourt and Barlowe, 2010). Although a direct interaction of ERD2 with COPII subunits has not yet been reported, ERD2 in mammalian cells has been shown to colocalize partially with Sec13 in punctate structures, which have been interpreted as representing COPII vesicles (Majoul et al., 2001). On the other hand, and consistent with COPI-mediated Golgi-to-ER trafficking, the mammalian KDEL receptor has been shown to interact with the GTPase ARF1, ARF GTPase-activating protein 1 (ARF-GAP1) and COPI subunits (Aoe et al., 1997; Aoe et al., 1998; Majoul et al., 2001). Interaction of ERD2 with coatomer involves a KKXSXXX motif in its C-terminal tail which is only active when serine 209 is phosphorylated (Cabrera et al., 2003). It has also been proposed that upon ligand binding, KDEL receptors oligomerize thereby facilitating their inclusion in COPI vesicles (Aoe et al., 1997).

HDEL and KDEL signals are both necessary and sufficient for ER localization in plants (Denecke et al., 1992; Napier et al., 1992; Hadlington and Denecke, 2000). The Arabidopsis genome contains seven ERD2-like proteins, which can be grouped in two classes, two belonging to class I (ERD2a and ERD2b) and the other 5, more distantly related that belong to class II. The same number seems to exist in *Nicotiana tabacum* (Xu et al., 2012). Arabidopsis ERD2a has been proposed to contain six transmembrane domains, with both termini on the cytosolic side of the membrane (Brach et al., 2009), and can complement the yeast *erd2* mutant, as it is the case for *N. benthamiana* ERD2a and ERD2b (Lee et al., 1993; Xu et al., 2012). *N. benthamiana* ERD2a/2b co-silencing resulted in the escape of both GFP-K/HDEL and BiP (an HDEL-containing ER resident chaperone) from the ER, suggesting

that both ERD2a and ERD2b also act as ER-luminal receptors for retrieval of K/HDEL-containing proteins in plants (Xu et al., 2012). Arabidopsis ERD2b has also been proposed to be a specific HDEL receptor for calreticulin3 (CTR3) (but not for CRT1 or CRT2 or BiP), allowing its retrograde transport from the Golgi to the ER (Li et al., 2009). Recently, *N. benthamiana* ERD2a/2b have been found to form homo- or hetero-oligomers and to interact with ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) and its potential GTPase-activating proteins (GAPs) (Xu and Liu, 2012), suggesting that ERD2 oligomerization may also contribute to its sorting into COPI vesicles in plants. Arabidopsis ERD2 proteins also contain a serine residue in their C-terminus, but in contrast to the situation in mammalian cells (see above), it is located upstream the lysine residues and there is no evidence of this residue being phosphorylated. In terms of their subcellular distribution in plants, fluorescently-tagged ERD2 proteins in plants have been shown to localize either to the Golgi apparatus, with a lesser level of labeling in the ER (Boevink et al., 1998; Brandizzi et al., 2002; Li et al., 2009) or to be equally distributed to the ER and the Golgi (Xu et al., 2012).

p24 proteins are small (20–25 kDa) type I membrane proteins which cycle between ER and Golgi and are enriched in COPI and COPII vesicles (for reviews, see Strating and Martens, 2009; Dancourt and Barlowe, 2010). They have luminal GOLD (GOLgi Dynamics) and coiled-coil domains, a single transmembrane domain, and a short cytoplasmic C-terminal tail which contains signals for binding COPI and COPII subunits (Strating and Martens, 2009; Dancourt and Barlowe, 2010). Whereas the luminal GOLD domain has been proposed to interact with putative cargo proteins (Anantharaman and Aravind, 2002; Carney and Bowen, 2004), the coiled-coil domain is involved in oligomerization of p24 proteins. The latter has been shown to be important for their coupled transport at the ER-Golgi interface and determines their steady-state localization (Füllerkrug et al., 1999; Gommel et al., 1999; Ciufu and Boyd, 2000; Emery et al., 2000; Jenne et al., 2002; Langhans et al., 2008; Montesinos et al., 2012; Hirata et al., 2013; Montesinos et al., 2013).

Heteromeric p24 protein complexes are also able to interact both with the GDP-bound form of ARF1 and with the coatamer complex (Popoff et al., 2011). They are thus considered to be essential for COPI vesicle budding from Golgi membranes (Aguilera-Romero et al., 2008). Consistent with these observations, p24 proteins have been proposed to participate in the retrograde transport of

ERD2. Thus, p24 mutants in yeast were found to show increased expression and secretion of the ER-resident chaperone Kar2/BiP, implicating p24 proteins in the ERD2-mediated ER retention of HDEL ligands (Belden and Barlowe, 2001). Furthermore, the ERD2-mediated retrograde Golgi to ER transport of cholera toxin (see above) was also shown to involve p23 (p24 δ subfamily) (Majoul et al., 2001).

In contrast to animals and fungi, which have at least one member of each of the four subfamilies (p24 α , p24 β , p24 γ and p24 δ), plants have only members of the p24 δ and the p24 β subfamilies (Strating et al., 2009). In particular, Arabidopsis contains 2 members of the beta subfamily (p24 β 2 and β 3) and 9 members of the delta subfamily (Chen et al., 2012; Montesinos et al., 2012, Montesinos et al., 2013). The delta subfamily of Arabidopsis p24 proteins contains signals for binding both COPI and COPII subunits, and thus for anterograde and retrograde transport, although they bind COPI with higher affinity than COPII (Contreras et al., 2004a and 2004b). In previous papers we have demonstrated that p24 proteins of the delta subfamily localize predominantly to the ER, while p24 β proteins localize to the Golgi apparatus (Montesinos et al., 2012; Montesinos et al., 2013). Moreover, we have recently demonstrated that Arabidopsis p24 proteins can form heteromeric complexes between members of the beta and delta subfamilies. This facilitates their coupled transport in the early secretory pathway but is also important for their stability (Montesinos et al., 2012, Montesinos et al., 2013).

In this work, we have investigated the mechanisms involved in trafficking of ERD2 proteins in plants and the possible involvement of p24 proteins. We show that p24 δ proteins and HDEL ligands shift the steady-state distribution of ERD2 proteins from the Golgi to the ER, an effect which requires their luminal GOLD (but not the coiled-coil) domain. p24 δ 5 also inhibits the secretion of HDEL ligands, but not constitutive secretion, consistent with its role in retrograde Golgi-to-ER transport. In addition, we show that p24 δ 5 and p24 δ 9 interact directly with ERD2. This interaction requires the GOLD domain in p24 δ 5 and is much greater at acidic than at neutral pH, consistent with both proteins interacting at the *cis*-Golgi for retrograde Golgi-to-ER transport. Both p24 δ 5 and ERD2 interact with ARF1 and COPI subunits, mostly at acidic pH, consistent with COPI vesicles being involved in

retrograde transport of both proteins. In contrast, both proteins interact with the COPII subunit Sec23 mostly at neutral pH, consistent with this interaction taking place at the ER for anterograde transport to the Golgi apparatus.

RESULTS

Plant p24 delta proteins partially shift the steady-state distribution of the K/HDEL receptor ERD2 from the Golgi to the ER, an effect which requires their luminal GOLD domain

To investigate a putative role of p24 proteins of the delta subfamily in retrograde Golgi-to-ER transport of the K/HDEL receptor ERD2 in plants, we transiently co-expressed ERD2a-YFP (Brandizzi et al. 2002) with RFP-p24 δ 5 (δ 1-subclass) or RFP-p24 δ 9 (δ 2-subclass) in tobacco mesophyll protoplasts and analyzed the steady-state localization of ERD2a-YFP by CLSM (Figures 1-2 and Figure S1). When expressed individually, ERD2a-YFP mainly localized to Golgi stacks (73 % of protoplasts) (Figure 1a), while in a small proportion of protoplasts ERD2a-YFP localized to both ER and Golgi or ER alone (Figure 2 and Figure S1). However, in the presence of RFP-p24 δ 5, there was a significant shift in the steady-state localization of ERD2a-YFP towards the ER, where both proteins colocalized, as we have shown previously (Montesinos et al., 2013). As quantified in Figure 2, the percentage of protoplasts where ERD2a-YFP localized to Golgi stacks decreased to a 16 % when co-expressed with RFP-p24 δ 5. In the remaining protoplasts, ERD2a-YFP localized both to ER and Golgi (58 %) (main pattern, Figure 1), or ER only (27 %) (Figure S1). As previously shown, this effect requires the dilysine motif at the cytosolic C-terminus of p24 δ 5, which is needed to bind the COPI subunits required for the retrograde Golgi-to-ER transport of p24 δ 5 (Montesinos et al., 2013). Since all Arabidopsis p24 proteins of the delta subfamily share this dilysine motif (including members of the δ 1- and δ 2-subclasses), we reasoned that other p24 proteins of the delta subfamily may also influence the steady-state distribution of ERD2a. As shown in Figure 1 and quantified in Figure 2, overexpression of RFP-p24 δ 9 (δ 2 subclass) also produced a partial redistribution of ERD2a-YFP from the Golgi to the ER.

We next investigated whether the luminal GOLD and coiled-coil domains may play a role in the effect of p24 δ 5 on the localization of ERD2a. To this end, we co-expressed ERD2a-YFP with RFP-p24 δ 5 deletion mutants lacking the GOLD and/or the coiled-coil (CC) domain. These deletion mutants have been previously shown to cycle in the early secretory pathway, indicating that the GOLD and

coiled-coil domains are not required for trafficking and localization of RFP-p24 δ 5 in the early secretory pathway (Montesinos et al., 2012). Furthermore, deletion mutants lacking the dilysine motif (which were no longer retrieved to the ER) were able to reach the Golgi and the PVC, suggesting that these domains are not required for post-Golgi trafficking of p24 δ 5 (Montesinos et al., 2012). As shown in Figure S2 and quantified in Figure 2, the deletion mutant lacking the coiled-coil domain, RFP-p24 δ 5(Δ CC), caused a partial relocation of ERD2a-YFP to the ER, similar to that of wild-type RFP-p24 δ 5. In clear contrast, the deletion mutant lacking the GOLD domain had almost no effect on the localization of ERD2a-YFP (Figures 1 and 2). These results support that the GOLD domain in p24 δ 5 is involved in the redistribution of ERD2a from the Golgi to the ER. Consistent with these data, a deletion mutant lacking both the GOLD and the coiled-coil domains, and thus bearing only the transmembrane (TM) domain and the cytoplasmic tail (CT) (RFP-p24 δ 5^{TM-CT}), had no effect on the localization of ERD2a (Figure 2 and Figure S2).

We also analyzed the effect of p24 δ 5 and p24 δ 9 on the steady-state distribution of ERD2a-YFP by transient expression in tobacco leaf epidermal cells. When expressed alone, ERD2a-YFP mainly localized to punctate Golgi structures, where it colocalized with the Golgi marker ManI-RFP (Figure 3a-c). This is consistent with the steady-state localization of ERD2a in tobacco protoplasts and with previous studies with this marker (Boevink et al., 1998; Brandizzi et al., 2002). In clear contrast, when ERD2a-YFP was co-expressed with RFP-p24 δ 5 or RFP-p24 δ 9, there was a noticeable shift in the localization of ERD2a-YFP, which localized both to punctate Golgi structures but also to the ER network. Here, it colocalized with both RFP-p24 δ 5 and RFP-p24 δ 9 (Figure 3), consistent with the results obtained in tobacco protoplasts (Figures 1 & 2). We used the same approach to investigate the effect of p24 δ 5 on the localization of the second member of class I ERD2 proteins, ERD2b. As shown in Figure 3, YFP-ERD2b localized to Golgi stacks, where it colocalized with ManI-RFP, as described previously (Li et al., 2009), but relocated partially to the ER upon co-expression with RFP-p24 δ 5. Therefore, p24 δ 5 affects the steady-state localizations of both ERD2a and ERD2b.

HDEL ligands induce a partial relocation of ERD2 proteins to the ER

Early observations indicated that overexpression of HDEL ligands induced a redistribution of the human KDEL receptor from the Golgi complex to the ER (Lewis and Pelham, 1992). Later, it was proposed that ligand binding induced oligomerization of ERD2 and its inclusion in retrograde COPI-coated vesicles (Majoul et al., 2001). Therefore, we decided to investigate whether HDEL ligands also induced a redistribution of *Arabidopsis* ERD2 proteins. To this end, we co-expressed ERDa-YFP or YFP-ERD2b with an HDEL-ligand, Cherry-HDEL, in tobacco leaf epidermal cells. As shown in Figures 3 and 4, overexpression of Cherry-HDEL produced a significant redistribution of both ERDa and ERDb to the ER, although both proteins also localized to Golgi stacks.

ERD2 proteins and/or p24 δ 5 inhibit secretion of HDEL ligands

We next reasoned that if p24 δ 5 facilitates retrograde Golgi-to-ER transport of ERD2 proteins, this should increase retrieval of HDEL ligands to the ER and therefore inhibit their secretion. To test for this hypothesis, we transiently co-expressed p24 δ 5 with GFP-HDEL in tobacco mesophyll protoplasts. GFP-HDEL mostly localizes to the ER, but can be partially secreted upon overexpression, like other HDEL ligands (Phillipson et al., 2001). GFP-HDEL secretion was monitored by analyzing the amount of this marker in protoplasts and in concentrated culture medium by Western blotting with anti-GFP serum (Figures 5 and S3). As a control, we used a secretory reporter, Sec-GFP, which lacks a K/HDEL signal and is mostly secreted into the medium (Disanesebastiano et al., 1998; Leucci et al., 2007) (Figures 5 and S3). As shown in Figure 5, co-expression of RFP-p24 δ 5 produced a significant inhibition of GFP-HDEL secretion. A similar inhibition was obtained when we expressed ERD2a-YFP, which suggests that this construct is at least partially functional in the Golgi-to-ER transport of HDEL ligands. Co-expression of both ERDa-YFP and RFP-p24 δ 5 produced a further decrease in secretion of GFP-HDEL. The effect of p24 δ 5 on secretion of GFP-HDEL was dependent on the GOLD domain, since a deletion mutant lacking this domain (expressed at comparable levels) was without effect, in contrast to the deletion mutant lacking the coiled-coil domain (Figure 5). Overexpression of GFP-HDEL (in contrast to that of Sec-GFP) also lead to an increased secretion of

BiP, an endogenous HDEL-ligand (Figure 5 and Figure S3). Interestingly, co-expression of either ERD2a-YFP or RFP-p24 δ 5 (but not RFP-p24 δ 5 Δ GOLD) also inhibited the secretion of BiP, while co-expression of both ERD2a and p24 δ 5 produced a further decrease in BiP secretion, as was the case with GFP-HDEL. In clear contrast, neither ERD2a-YFP nor RFP-p24 δ 5 had a significant effect on overall secretion, as shown by monitoring Sec-GFP secretion (Figure 5), indicating that the effect of ERD2a and p24 δ 5 is specific for HDEL ligands.

p24 δ 5 and p24 δ 9 interact with ERD2a in a pH-dependent manner

We next investigated whether the effect of p24 δ 5 on the localization of ERD2a could be mediated by a direct interaction between both proteins. To this end, ERD2a-YFP was co-expressed with RFP-p24 δ 5 and a post-nuclear supernatant (PNS) was obtained. A fraction of this PNS was further centrifuged to obtain a membrane fraction. Either PNS or membranes were extracted in detergent and insoluble material was pelleted by centrifugation; detergent extracts were used in pull-down experiments using a RFP-trap for the pull-down of RFP-p24 δ 5 and a GFP antibody to analyze for the presence of ERD2a-YFP by Western blotting. As a negative control, we expressed RFP-p24 δ 5 alone. To test whether the interaction of p24 δ 5 and ERD2a occurs at the acidic pH of the Golgi apparatus (for retrograde transport to the ER) or else at the neutral pH of the ER, pull-down experiments were performed at different pH values ranging from 7.5 to 5.5. As shown in Figure S4, the interaction between both proteins was much more efficient when using PNS, which may be due to the higher amount of the two proteins used as input for the pull-downs or else to the requirement of soluble factors that were not present in the membrane fraction. The interaction between RFP-p24 δ 5 and ERD2a-YFP increased as the pH decreased from 7.5 to 5.5, with maximal interaction already at pH 6.0 (Figure 6). This pH change did not have a significant effect in the pull-down of RFP-p24 δ 5, and affected only the interaction of RFP-p24 δ 5 with ERD2a-YFP. The same was true when we used a GFP-trap to pull-down ERD2a-YFP and tested for the interaction with RFP-p24 δ 5 by Western blotting with RFP antibodies. In this case, the negative control was to express ERD2a-YFP alone. As shown in Figure 6 and quantified in Figure 7, both proteins interacted very efficiently at pH 6.0, while

the interaction was much lower at pH 7.5. As additional negative controls, we checked that pull-downs of RFP-p24 δ 5 (using the RFP-trap) or ERDa-YFP (using the GFP-trap) were completely devoid of abundant markers of ER (calnexin-GFP) or Golgi (ManI-RFP/GFP), which were co-expressed with RFP-p24 δ 5 and ERD2a-YFP under the same conditions used to test for the interaction between these proteins, either at pH 6.0 or at pH 7.5 (Figure S5). We next monitored whether RFP-p24 δ 9 also interacts with ERD2a-YFP, using both a RFP-trap to pull-down RFP-p24 δ 9 or a GFP-trap to pull-down ERD2a-YFP, using the corresponding negative controls, as above. As shown in Figure 8 and quantified in Figure 7, p24 δ 9 also interacted with ERD2a, and the interaction was much higher at pH 6.0 than at pH 7.5, as it was the case with p24 δ 5. Therefore, the interaction between p24 δ 5/9 and ERD2a is likely to occur mainly at the acidic pH of the Golgi apparatus.

We have previously used similar pull-down experiments to demonstrate the interaction between RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2, which was shown to occur at ER export sites (Montesinos et al. 2012). Therefore, we also investigated the pH-dependence of such interaction. As shown in Figure S6 and quantified in Figure 7, the interaction between RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 was more efficient at pH 7.5 than at pH 6.0, in contrast with the interaction between RFP-p24 δ 5 and ERD2a-YFP.

Interaction between p24 δ 5 and ERD2a requires the GOLD domain in p24 δ 5

Since the GOLD but not the coiled-coil domain in p24 δ 5 is required for its effect in the steady-state localization of ERD2a and on secretion of HDEL ligands, we analyzed whether this domain was also important for the interaction between p24 δ 5 and ERD2a. To this end, we performed the pull-down experiments using deletion mutants lacking the GOLD or the coiled-coil domains. As shown in Figure 9 and quantified in Figure 7, the deletion mutant lacking the coiled-coil domain still interacted very efficiently with ERD2a-YFP, which is consistent with the confocal data showing an effect of this deletion mutant on the localization of ERD2a-YFP similar to that of the wild-type protein. In clear contrast, the deletion mutant lacking the GOLD domain showed roughly a 70 % decrease in the ability to interact with ERD2a-YFP. These data suggest that the GOLD domain, in contrast to the coiled-coil

domain, is essential for the interaction between p24 δ 5 and ERD2a. In summary, the effect of p24 δ 5 on the localization of ERD2 proteins requires both the dilysine motif in its cytosolic terminus (Montesinos et al., 2013) and the luminal GOLD domain.

Endogenous p24 δ 5 but not p24 β 2 interacts with ERD2b at acidic pH

To test for interaction between endogenous ERD2 and p24 δ 5, we performed co-immunoprecipitation experiments with Arabidopsis cell suspension cultures. Similar co-immunoprecipitation experiments were previously used to demonstrate that p24 proteins interact with GPI-anchored proteins at neutral but not at acidic pH (Fujita et al., 2011). Here, we used antibodies against the cytoplasmic tail of p24 δ 5 and p24 β 2 (Montesinos et al., 2012). As shown by Western blotting using ERD2b antibodies (Li et al., 2009), immunoprecipitation of p24 δ 5 co-immunoprecipitated ERD2b (Figure 10). Interestingly, this was only observed when the co-immunoprecipitation was performed at pH 6.0, but not at pH 7.5. This is consistent with the results obtained in the pull-down experiments using transiently expressed proteins, and suggests that the interaction between p24 δ 5 and ERD2 proteins mostly occurs at the acidic pH of the Golgi apparatus. In clear contrast, immunoprecipitation of p24 β 2, which caused the co-immunoprecipitation of p24 δ 5, as shown previously (Montesinos et al., 2012), did not cause the co-immunoprecipitation of ERD2b, which suggests that only p24 proteins of the delta subfamily (which contain signals for COPI binding) are able to interact with ERD2 proteins for retrograde Golgi-to-ER transport. In the same experiment we also monitored the interaction between p24 β 2 and p24 δ 5. As shown in Figure 10, immunoprecipitation of p24 δ 5 caused the co-immunoprecipitation of p24 β 2 and *vice versa*. However, in contrast with the interaction between p24 δ 5 and ERD2, the interaction between p24 δ 5 and p24 β 2 occurred at both pHs, although it was greater at pH 7.5 than at pH 6.0 (see quantification in Figure 7). This is also consistent with the results obtained using transiently expressed proteins and suggests that p24 δ 5 and p24 β 2 also interact at the ER for their coupled ER-to-Golgi transport, as we have previously proposed (Montesinos et al., 2012) while p24 δ 5 and ERD2 proteins mostly interact at the Golgi apparatus for their retrograde Golgi-to-ER transport.

Both p24 δ 5 and ERD2a interact with COPI and COPII subunits in a pH-dependent manner

Both p24 δ 5 and ERD2 are expected to interact with COPI or COPII subunits for their bidirectional transport between the ER and the Golgi apparatus. Using *in vitro* binding assays, we have previously identified the sorting signals in the cytosolic tail of p24 δ 5 involved in COPI and COPII binding (Contreras et al., 2004a and 2004b). We aimed here to monitor binding of COPI and COPII subunits to both ERD2 and p24 δ 5 and investigated the pH-dependence of these interactions. As shown in Figure 11, both RFP-p24 δ 5 and ERD2a-YFP had the ability to interact with COPI subunits, as shown by Western blotting with an antibody which recognizes both α - and γ -COP (Harter et al., 1996) and which was previously shown to recognize their Arabidopsis orthologs (Contreras et al., 2004a). Interestingly, this interaction was much higher at pH 6.0 than at pH 7.5 (Figure 7). The same happened when we analyzed ARF1 binding: both ERD2a and p24 δ 5 interacted with ARF1 at acidic but not at neutral pH (Figure 7). When both proteins were co-expressed, there was no further increase in binding of ARF1 or coatomer. This suggests that the interaction between ERD2 and p24 δ 5 has no influence in COPI binding of the individual proteins.

We also monitored the interaction of p24 δ 5 and ERD2 with COPII subunits, using antibodies against the COPII subunit Sec23. As shown in Figure 11, both p24 δ 5 and ERD2a interacted with Sec23 but, in contrast to binding of ARF1 and COPI subunits, binding was more efficient at pH 7.5 than at pH 6.0 (Figure 7).

DISCUSSION

The importance of p24 proteins in intracellular transport

Over the years, p24 proteins have been shown to play important functions in protein transport in the secretory pathway. These include the biogenesis of COPI and COPII vesicles and the sorting of proteins into these vesicles (Schimmöller et al., 1995; Belden and Barlowe, 1996; Wen and Greenwald, 1999; Belden and Barlowe, 2001; Muñiz et al., 2000; Aguilera-Romero et al., 2008; Takida et al., 2008; Castillon et al., 2011; Fujita et al., 2011), the formation of ER exit sites (ERES) (Lavoie et al., 1999) and the biogenesis of the Golgi apparatus (Rojo et al., 2000; Mitrovic et al., 2008;

Koegler et al., 2010). To perform these functions, p24 proteins have long been proposed to function as cargo receptors facilitating the transport of specific cargoes between ER and Golgi. However, the actual demonstration of p24 proteins acting as cargo receptors is only very recent. In mammals and yeast, p24 hetero-oligomeric complexes have been shown to participate in the transport of correctly remodeled GPI-anchored proteins (GPI-APs) (Takida et al., 1998; Castillon et al., 2011; Fujita et al., 2011). Interestingly, binding of p24 complexes to GPI-anchors only occurs at neutral pH, which probably causes GPI-APs to concentrate at ERES enabling their efficient sorting into COPII vesicles (Fujita et al., 2011). Once in the Golgi, at a lower pH, p24 complexes can no longer bind to GPI-APs and thus dissociate, allowing p24 proteins to be recycled back to the ER in COPI vesicles and GPI-APs to continue their transport to the cell surface (Fujita et al., 2011). This was the first example of a pH-dependent transport of a cargo molecule between ER and Golgi mediated by p24 proteins. In plants, two examples for p24 cargo molecules have recently been published: a member of the p24 delta subfamily, p24 δ 4, has been shown to be involved in trafficking of the myrosinase-associated protein GLL23 (Jancowski et al. 2013); another member of the delta subfamily, p24 δ 5, has been proposed to be involved in the retrograde Golgi-to-ER transport of ERD2 (Montesinos et al. 2013).

Retrograde transport of the K/HDEL receptor ERD2 is enhanced by HDEL ligands and p24 proteins

In animal cells, the KDEL receptor mainly localizes to early Golgi compartments under steady-state conditions. However, upon overexpression of KDEL-bearing secretory proteins ERD2 redistributes to the ER (Lewis and Pelham, 1992). This curious feature has been elegantly confirmed by experiments using cholera toxin (CTX), which enters cells via caveolae and is transported down the endocytic pathway until it reaches the Golgi apparatus. In the Golgi, it dissociates into the A and B subunits, the former of which acts as a KDEL ligand (Majoul et al., 1998). In this way, a wave of the KDEL ligand (CTX-A subunit) could be seen to reach the Golgi, and its further retrograde transport to the intermediate compartment and the ER could be precisely monitored and visualized together with fluorescently tagged ERD2. Redistribution of ERD2 was postulated to involve ligand-induced

clustering of the receptor, recruitment of COPI proteins and retrograde Golgi-to-ER transport mediated by COPI vesicles (Aoe et al., 1997; Majoul et al., 1998). Consistent with these results, we now show that overexpression of an HDEL-ligand also produces a partial redistribution of Arabidopsis ERD2a and ERD2b from the Golgi to the ER. The same effect was observed upon overexpression of p24 delta proteins, consistent with previous data showing that p23 associates with the KDEL receptor during its Golgi-to-ER transport (Majoul et al., 1998). The fact that overexpression of p24 δ 5 prevents the secretion of artificial (GFP-HDEL) and endogenous (BiP) HDEL ligands, but not constitutive secretion in transport assays, argues that increased function of p24 δ 5 may favor retrograde transport of ERD2 proteins bound to their ligands, thus changing their steady-state localization. This effect may be mediated by a direct interaction between both proteins, a process which requires the GOLD domain in p24 δ 5. However, whether this reflects a direct interaction between this domain and a luminal loop domain of ERD2 remains to be shown.

pH and ERD2 function

Binding of KDEL ligands *in vitro* to the ERD2 receptor has been shown to be pH-dependent, with maximal binding at acidic pH (pH 5.0) and very low binding efficiency at neutral pH (7.5) (Wilson et al., 1993; Scheel and Pelham, 1996). But how do the actual pH values for the ER and *cis*-Golgi compare with these extremes? The pH in the ER and *cis*-Golgi of animal cells is usually given as 7.2 and 6.7, respectively (Paroutis et al., 2004). The pH in the ER of plants has been measured as 7.5 (tobacco epidermis), 7.7 (Arabidopsis root tips), 7.1 (Arabidopsis protoplasts) (Martinière et al., 2013). Only one value is available for the pH in the *cis*-Golgi: 6.8 (Shen et al. 2013). Thus, in both systems there is an acidification of only around 0.5 pH units between the ER and the *cis*-Golgi. One should note that pH measurements of the *cis*-Golgi do not distinguish between first and second *cis*-cisternae and the term *cis*-Golgi is not restricted to the first, forming, cisterna of the Golgi stack, but probably also includes at least the next cisterna in a typical Golgi stack of 6-7 cisternae (Donohoe et al., 2013). This means that ERD2-ligand binding and COPI-cargo retrieval may well take place in /from the second-most *cis*-cisterna. Nevertheless, is such a small gradient in pH sufficient to support a

pH-based model for ERD2 ligand binding and release? In this regard, Dancourt and Barlowe (2010) have pointed out that while small “differences in pH between compartments of the early secretory pathway may only have modest influence on amino acid residues at specific ligand-binding sites” the effects of these “slight pH differences could be amplified by inducing conformational changes“. In the case of the ERD2 receptor, Wilson et al. (1993) noted that, while binding of KDEL ligands may occur at a sub-optimal pH in the Golgi apparatus, in terms of the pH response it is not the absolute affinity for ligand in the Golgi apparatus that is important, but rather the difference between the affinities in the Golgi and the ER.

pH and COPI/COPII binding to p24delta5 and ERD2

The retrograde Golgi-to-ER transport of ERD2 (ERD2a) is strictly dependent on the dilysine motif in the cytosolic tail of p24 δ 5 (Montesinos et al., 2013). p24 δ 5 has also been shown to bind both ARF1-GDP and coatamer (COPI) subunits, via dilysine and diphenylalanine motifs acting cooperatively. In this manuscript, we have established that binding of ARF1 and COPI by p24 δ 5 mainly occurs at acidic pH. This is consistent with previous observations showing that binding of cytosolic ARF1 and COPI subunits to endosomal membranes requires an acidic pH in the lumen of early endosomes (Aniento et al., 1996; Gu et al., 1997; Gu and Gruenberg, 2000), and suggests that a conformational change in p24 δ 5 at the more acidic pH of the Golgi lumen might also favor binding of COPI subunits. On the other hand, p24 δ 5 also interacts with COPII subunits via a diphenylalanine motif (Contreras et al, 2004a,b). We now show that, in contrast to COPI, binding of the COPII subunit Sec23 to p24 δ 5 occurs more efficiently at neutral (7.5) than at acidic (6.0) pH. We also find that ERD2 is able to bind Sec23 more efficiently at neutral than at acidic pH, and conversely binds both ARF1 and coatamer subunits at acidic rather than at neutral pH. Taken together, these data suggest that the binding of COPII coat proteins to both p24 δ 5 and ERD2 requires neutral pH conditions, whereas the recruitment of COPI coat proteins prefers an acidic pH.

In conclusion, the available data suggest the following transport model. The steady-state localization of the K/HDEL receptor ERD2 is the result of anterograde ER-to-Golgi transport of free

receptor molecules in COPII carriers and retrograde Golgi-to-ER transport of ERD2 molecules bound to K/HDEL ligands at the more acidic pH of the Golgi via COPI vesicles. The latter presumably involves ligand-induced oligomerization of ERD2 (Xu and Liu, 2012), which increases the probability of ERD2 to be sorted into COPI vesicles. This would explain why overexpression of HDEL ligands shifts the steady-state distribution of ERD2 from the Golgi to the ER by increasing retrograde transport. In addition, binding of ARF1 and COPI subunits by ERD2 is also favored at the more acidic pH of the Golgi apparatus. On the other hand, p24 proteins have also been proposed to be essential for the biogenesis of COPI vesicles (Aguilera-Romero et al., 2008) and indeed p24 δ 5 interacts with ARF1 and COPI subunits at acidic pH. By binding to ERD2 at the Golgi, p24 delta proteins may thus facilitate the sorting of ERD2 into COPI vesicles, which in turn enhances the retrograde transport of K/HDEL ligands bound to ERD2. This would explain why p24 δ 5 and p24 δ 9 also shift the steady-state distribution of ERD2 from the Golgi to the ER.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material

Arabidopsis thaliana cell suspension cultures (LT87) (Axelos *et al.*, 1992) were cultivated as described (Ortiz-Zapater *et al.*, 2006). Plants of *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana and wild-type *Nicotiana benthamiana* were grown as described previously (Maliga *et al.*, 1973; Lerich *et al.*, 2011).

Transient gene expression and secretion assays

Transient gene expression in tobacco leaf protoplasts was performed as described (Foresti *et al.*, 2006). Transient expression in wild type, *N. benthamiana* was performed as described previously (Lerich *et al.*, 2011), and fluorescence was analyzed 48-72 h after inoculation. The YFP-ERD2b construct (Li *et al.*, 2009) was kindly provided by Dr. C. Zipfel (The Sainsbury Laboratory, UK). The Sec-GFP construct (Disanesebastiano *et al.*, 1998; Leucci *et al.* 2007) was kindly provided by Dr. G.P. Di Sanesebastiano (University of Salento, Lecce, Italy). Other plasmids have been described previously: RFP-p24 δ 5, RFP-p24 δ 5(Δ CC), RFP-p24 δ 5(Δ GOLD) and RFP-p24 δ 5(TM-CT) (Langhans *et al.*, 2008; Montesinos *et al.*, 2012); RFP-p24 δ 9 (Montesinos *et al.*, 2013); Man1-GFP (Nebenführ *et al.*, 1999); GFP-HDEL (Nebenführ *et al.*, 2000); ERD2a-YFP (Brandizzi *et al.*, 2002).

Secretion assays were performed as previously described (Crofts *et al.*, 1999). Briefly, transfected protoplasts were centrifuged for 5 min at 100xg to separate floating protoplasts from the culture medium. Medium was collected and protoplasts were sedimented by centrifugation and resuspended in the same volume of the original suspension. Where indicated, culture medium was concentrated 5x by methanol/chloroform precipitation of proteins. Equal volumes of protoplasts and medium were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against GFP (to detect GFP-HDEL and Sec-GFP) or BiP (Figure S3). In addition, protoplasts were also analyzed by Western blotting with antibodies against RFP (to detect RFP-p24 δ 5 and deletion mutants) or GFP (to detect ERD2-YFP). Western blots were analyzed using the ChemiDoc XRS+ imaging system (Bio-Rad). Western-blot in the linear range of detection were quantitated using the Quantity One software (Bio-Rad). Secretion of GFP-HDEL, Sec-GFP or BiP was calculated as the percentage of the amount of these markers in the

medium (extracellular) with respect to their amount in the protoplasts (intracellular), as described previously (Philipson et al., 2001).

Confocal microscopy

Imaging was performed using an Olympus FV1000 confocal microscope with 60x water lens. Fluorescence signals for GFP (488 nm/496–518 nm), YFP (514 nm/529–550 nm) and RFP (543 nm/593–636 nm) were detected. Sequential scanning was used to avoid any interference between fluorescence channels. Post-acquisition image processing was performed using the FV10-ASW 3.1 Viewer and CorelDrawX4 (14.0.0.567) or ImageJ (v.1.45m).

Preparation of membrane extracts, co-immunoprecipitation, pull-down experiments and western blotting

Membrane fractions were obtained from *Arabidopsis* cell suspension cultures (LT87) or tobacco protoplasts as described previously (Montesinos et al., 2012). Membranes from *Arabidopsis* cell suspension cultures (LT87) were extracted with a lysis buffer containing 150 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.5% Triton X-100 and either 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 or 50 mM MES, pH 6.0 and detergent extracts were used for co-immunoprecipitation. Tobacco protoplasts were collected by centrifugation and washed twice with homogenization buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.3 M sucrose, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 3 mM EDTA and a cocktail of protease inhibitors (Sigma)). Pellets were resuspended 1:1 (v/v) in homogenization buffer and cells disrupted by sonication (4 x15 s). Homogenates were centrifuged and the post-nuclear supernatant (PNS) was collected. PNS was diluted with lysis buffer at different pHs or else centrifuged to obtain a membrane fraction, which was extracted as described before. After a 5 min centrifugation at 16,000 x g to remove detergent-insoluble material, PNS or membrane extracts were used for pull-down experiments.

Co-immunoprecipitation experiments were performed using C-terminal p24 δ 5 or p24 β 2 antibodies covalently bound to magnetic beads (Dyna, Invitrogen), as described previously

(Montesinos et al., 2012). Pull-down experiments were performed using RFP-Trap or GFP-Trap magnetic beads (Chromotek), as described (Montesinos et al., 2013).

Protein extracts from membrane fractions, co-immunoprecipitation experiments or pull-downs were analyzed by SDS-PAGE and western blotting and quantified as described above. ERD2b antibodies (Li et al., 2009) were kindly provided by Dr. C. Zipfel (The Sainsbury Laboratory, UK). Antibodies against RFP and GFP were obtained from Clontech and Life Technologies, respectively. Antibodies against p24 δ 5 and p24 β 2 (Montesinos et al. 2012), alfa/gamma-COP (Harter et al. 1996) and ARF1 (Pimpl et al., 2000) have been described previously.

ACKNOWLEDGEMENTS

F.A. was supported by the Ministerio de Economía y Competitividad (grant no BFU2012_33883) and Generalitat Valenciana (ISIC/2013/004 and ACOMP/2014/202). J.C.M. and N.P. were recipients of a fellowship from Ministerio de Educación (FPU program). We thank the greenhouse section and the microscopy section of SCSIE (University of Valencia) and Pilar Selvi for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Aguilera-Romero, A., Kaminska, J., Spang, A., Riezman, H. and Muñiz, M.** (2008) The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* **180**, 713-720.
- Anantharaman, V. and Aravind, L.** (2002) The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol.* **3**, research0023.
- Aniento, F., Gu, F., Parton, R.G. and Gruenberg, J.** (1996) An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J Cell Biol.* **133**, 29-41.
- Aoe, T., Cukierman, E., Lee, A., Cassel, D., Peters, D.J. and Hsu, V.W.** (1997) The KDEL receptor, ERD2, regulates intracellular traffic by recruiting a GTPase-activating protein for ARF1. *EMBO J.* **16**, 7305-7316.
- Aoe, T., Lee, A.J., van Donselaar, E., Peters, P.J. and Hsu, V.W.** (1998) Modulation of intracellular transport by transported proteins: insight from regulation of COPI-mediated transport. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**, 1624-1629.
- Axelos, M., Curie, C., Bardet, C. and Lescure, B.** (1992) A protocol for transient expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiol Biochem.* **30**, 123-128.
- Belden, W.J. and Barlowe, C.** (1996) Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem.* **271**, 26939-26946.
- Belden, W.J. and Barlowe, C.** (2001) Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J Biol Chem.* **276**, 43040-43048.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A. and Hawes, C.** (1998) Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* **15**, 441-447.

- Brach, T., Soyk, S., Müller, C., Hinz, G., Hell, R., Brandizzi, F. and Meyer, A.J.** (2009) Non-invasive topology analysis of membrane proteins in the secretory pathway. *Plant J.* **57**, 534-541.
- Brandizzi, F., Fricker, M. and Hawes, C.** (2002) A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**, 520-530.
- Bubeck, J., Scheuring, D., Hummel, E., Langhans, M., Viotti, C., Foresti, O., Denecke, J., Banfield, D.K. and Robinson, D.G.** (2008) The syntaxins SYP31 and SYP81 control ER-Golgi trafficking in the plant secretory pathway. *Traffic.* **9**, 1629-1652.
- Cabrera, M., Muñoz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martín, M.E. and Velasco, A.** (2003) The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol Biol Cell.* **14**, 4114-4125.
- Capitani, M. and Sallese, M.** (2009) The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett.* **583**, 3863-71.
- Carney, G.E. and Bowen, N.J.** (2004) p24 proteins, intracellular trafficking, and behaviour: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biol Cell.* **96**, 271-278.
- Castillon, G.A., Aguilera-Romero, A., Manzano-Lopez, J., Epstein, S., Kajiwara, K., Funato, K., Watanabe, R., Riezman, H. and Muñoz, M.** (2011) The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Mol Biol Cell.* **22**, 2924-2936.
- Chen, J., Qi, X. and Zheng, H.** (2012) Subclass-specific localization and trafficking of Arabidopsis p24 proteins in the ER-Golgi Interface. *Traffic.* **13**, 400-415.
- Ciufo, L.F. and Boyd, A.** (2000) Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway. *J Biol Chem.* **275**, 8382-8388.
- Contreras, I., Ortiz-Zapater, E. and Aniento, F.** (2004a) Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant ARF1 and coatomer. *Plant J.* **38**, 685-698.
- Contreras, I., Yang, Y., Robinson, D.G. and Aniento, F.** (2004b) Plant COPI and COPII coat proteins show a differential affinity for p24 cytosolic tails. *Plant Cell Physiol.* **45**, 1779-1786.

- Crofts, A.J., Leborgne-Castel, N., Hillmer, S., Robinson, D.G., Phillipson, B., Carlsson, L.E., Ashford, D.A. and Denecke, J.** (1999) Saturation of the endoplasmic reticulum retention machinery reveals anterograde bulk flow. *Plant Cell* **11**:2233-2248.
- Dancourt, J. and Barlowe, C.** (2010) Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem.* **79**, 777-802.
- Denecke, J., De Rycke, R. and Botterman, J.** (1992) Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J.* **11**, 2345-2355.
- Di Sansebastiano, G.P., Paris, N., Marc-Martin, S. and Neuhaus, J.M.** (1998) Specific accumulation of GFP in a non-acid vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. *Plant J* **15**,449-457.
- Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.P., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J. and Nilsson, T.** (1998) gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COPI and COPII coatomer. *J Cell Biol.* **140**, 751-765.
- Donohoe, B.S., Kang, B.H., Gerl, M.J., Gergely, Z.R., McMichael, C.M., Bednarek, S.Y. and Staehelin, L.A.** (2013) *Cis*-Golgi cisternal assembly and biosynthetic activation occur sequentially in plants and algae. *Traffic* **14**, 551-567.
- Emery, G., Rojo, M. and Gruenberg, J.** (2000) Coupled transport of p24 family members. *J Cell Sci.* **113**, 2507-2516.
- Foresti, O., DaSilva, L.L. and Denecke, J.** (2006) Overexpression of the Arabidopsis syntaxin PEP12/SYP21 inhibits transport from the prevacuolar compartment to the lytic vacuole in vivo. *Plant Cell* **18**, 2275-2293.
- Fujita, M., Watanabe, R., Jaensch, N., Romanova-Michaelides, M., Satoh, T., Kato, M., Riezman, H., Yamaguchi, Y., Maeda, Y. and Kinoshita, T.** (2011) Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI. *J Cell Biol.* **194**, 61-75.

- Füllerkrug, J., Sukanuma, T., Tang, B.L., Hong, W., Storrie, B. and Nilsson, T.** (1999) Localization and recycling of gp27 (hp24g3): complex formation with other p24 family members. *Mol Biol Cell*. **10**, 1939-1955.
- Gommel, D., Orci, L., Emig, E.M., Hannah, M.J., Ravazzola, M., Nickel, W., Helms, J.B., Wieland, F.T. and Sohn, K.** (1999) p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between organelles of the early secretory pathway. *FEBS Lett*. **447**, 179-185.
- Gu, F., Aniento, F., Parton, R.G. and Gruenberg, J.** (1997) Functional dissection of COP-I subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *J Cell Biol*. **139**, 1183-1195.
- Gu, F. and Gruenberg, J.** (2000) ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *J Biol Chem*. **275**, 8154-8160.
- Hadlington, J.L. and Denecke, J.** (2000) Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. *Curr Opin Plant Biol*. **3**, 461-468.
- Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehangel, S., Tschochner, H. and Wieland, F.** (1996) Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**, 1902-1906.
- Hirata, R., Nihei, C. and Nakano, A.** (2013) Isoform-selective oligomer formation of *Saccharomyces cerevisiae* p24 family proteins. *J Biol Chem*. **288**, 37057-37070.
- Jancowski, S., Catching, A., Pighin, J., Judo, T., Foissner, I. and Wasteneys, G.O.** (2013) Trafficking of the myrosinase-associated protein GLL23 requires NUC/MVP1/GOLD36/ERMO3 and the p24 protein CYB. *Plant J*. **77**, 497-510.
- Jenne, N., Frey, K., Brügger, B. and Wieland, F.T.** (2002) Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *J Biol Chem*. **277**, 46504-46511.
- Koegler, E., Bonnon, C., Waldmeier, L., Mitrovic, S., Halbeisen, R. and Hauri, H.P.** (2010) p28, a novel ERGIC/cis Golgi protein, required for Golgi ribbon formation. *Traffic*. **11**, 70-89.

- Langhans, M., Marcote, M.J., Pimpl, P., Virgili-López, G., Robinson, D.G. and Aniento, F.** (2008) In vivo trafficking and localization of p24 proteins in plant cells. *Traffic*. **9**, 770-785.
- Lavoie, C., Paiement, J., Dominguez, M., Roy, L., Dahan, S., Gushue, J.N. and Bergeron, J.J.** (1999) Roles for alpha(2)p24 and COPI in endoplasmic reticulum cargo exit site formation. *J Cell Biol*. **146**, 285-300.
- Lee, H.I., Gal, S., Newman, T.C. and Raikhel, N.V.** (1993) The Arabidopsis endoplasmic reticulum retention receptor functions in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**, 11433-11437.
- Lerich, A., Langhans, M., Sturm, S. and Robinson, D.G.** (2011) Is the 6kDa tobacco etch viral protein a bona fide ERES marker? *J Exp Bot*. **62**, 5013-5023.
- Leucci, M.R., Di Sansebastiano, G.P., Gigante, M., Dalessandro, G. and Piro, G.** (2007) Secretion marker proteins and cell-wall polysaccharides move through different secretory pathways. *Planta* **225**, 1001-1017.
- Lewis, M.J. and Pelham, H.R.** (1992) Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell*. **68**, 353-364.
- Lewis, M., Sweet, D. and Pelham, H.** (1990) The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell*. **61**, 1359-1363.
- Li, J., Zhao-Hui, C., Batoux, M., Nekrasov, V., Roux, M., Chinchilla, D., Zipfel, C. and Jones, J.D.** (2009) Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**, 15973-15978.
- Majoul, I., Sohn, K., Wieland, F.T, Pepperkok, R., Pizza, M., Hillemann, J. and Söling, H.D.** (1998) KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J. Cell Biol*. **143**, 601-612.
- Majoul, I., Straub, M., Hell, S.W., Duden, R. and Söling, H.D.** (2001) KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev Cell*. **1**, 139-153.

Maliga, P., Sz-Breznovits, A. and Marton, L. (1973) Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nat. New Biol.* **244**, 29–30.

Martinière, A., Bassil, E., Jublanc, E., Alcon, C., Reguera, M., Sentenac, H., Blumwald, E. and Paris, N. (2013) In vivo intracellular pH measurements in tobacco and Arabidopsis reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *Plant Cell.* **25**, 4028-4043.

Mitrovic, S., Ben-Tekaya, H., Koegler, E., Gruenberg, J. and Hauri, H.P. (2008) The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. *Mol Biol Cell.* **19**, 1976-1990.

Montesinos, J.C., Sturm, S., Langhans, M., Hillmer, S., Marcote, M.J., Robinson, D.G. and Aniento, F. (2012) Coupled transport of Arabidopsis p24 proteins at the ER-Golgi interface. *J Exp Bot.* **63**, 4243-4261.

Montesinos, J.C., Langhans, M., Sturm, S., Hillmer, S., Aniento, F., Robinson, D.G. and Marcote, M.J. (2013) Putative p24 complexes in Arabidopsis contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway. *J Exp Bot.* **64**, 3147-3167.

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

Munro, S. and Pelham, H. (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* **48**, 899-907.

Napier, R.M., Fowke, L.C., Hawes, C., Lewis, M. and Pelham, H.R. (1992) Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* **102**, 261-271.

Nebenführ, A., Frohlick, J.A. and Staehelin, L.A. (2000) Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiol.* **124**, 135-151.

Nebenführ, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B. and Staehelin, L.A. (1999) Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the actomyosin system. *Plant Physiol.* **121**, 1127-1142.

- Ortiz-Zapater, E., Soriano-Ortega, E., Marcote, M.J., Ortiz-Masiá, D. and Aniento, F.** (2006) Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. *Plant J.* **48**, 757-770.
- Paroutis, P., Touret, N. and Grinstein S.** (2004) The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology* **19**, 207-215.
- Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G. and Denecke, J.** (2001) Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell* **13**, 2005-2020.
- Pimpl, P., Movafeghi, A., Coughlan, S., Denecke, J., Hillmer, S. and Robinson, D.G.** (2000) In situ localization and in vitro induction of plant COPI-coated vesicles. *Plant Cell.* **12**, 2219-36.
- Popoff, V., Adolf, F., Brügger, B. and Wieland F.** (2011) COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011 Nov 1;3(11), a005231.
- Rojo, M., Emery, G., Marjomäki, V., McDowall, A., Parton, R.G. and Gruenberg, J.** (2000) The transmembrane protein p23 contributes to the organization of the Golgi apparatus. *J Cell Sci.* **113**, 1043-1057.
- Scheel, A.A. and Pelham, H.R.** (1996) Purification and characterization of the human KDEL receptor. *Biochemistry.* **35**, 10203-10209.
- Schimmöller, F., Singer-Krüger, B., Schröder, S., Krüger, U., Barlowe, C. and Riezman, H.** (1995) The absence of Em24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J.* **14**, 1329-1339.
- Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P. and Jiang, L.** (2013) Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol Plant.* **6**, 1419-1437.
- Semenza, J., Hardwick, K., Dean, N. and Pelham, H.** (1990) ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell.* **61**, 1349-1357.
- Strating, J.R. and Martens, G.J.** (2009) The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface. *Biol Cell.* **101**, 495-509.

Strating, J.R., van Bakel, N.H., Leunissen, J.A. and Martens, G.J. (2009) A comprehensive overview of the vertebrate p24 family: identification of a novel tissue-specifically expressed member. *Mol Biol Evol.* **26**, 1707-1714.

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

Townsley, F.M., Wilson, D.W. and Pelham, H.R. (1993) Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J.* **12**, 2821-2829

Wen, C. and Greenwald, I. (1999) p24 proteins and quality control of LIN-12 and GLP-1 trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* **145**, 1165-1175.

Wilson, D., Lewis, M. and Pelham, H. (1993) pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J Biol Chem.* **268**, 7465-7468.

Xu, G., Li, S., Xie, K., Zhang, Q., Wang, Y., Tang, Y., Liu, D., Hong, Y., He, C. and Liu, Y. (2012) Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity. *Plant J.* **72**, 57-69.

Xu, G. and Liu, Y. (2012) Plant ERD2s self-interact and interact with GTPase-activating proteins and ADP-ribosylation factor 1. *Plant Signal Behav.* **7**, 1092-1094.

FIGURES

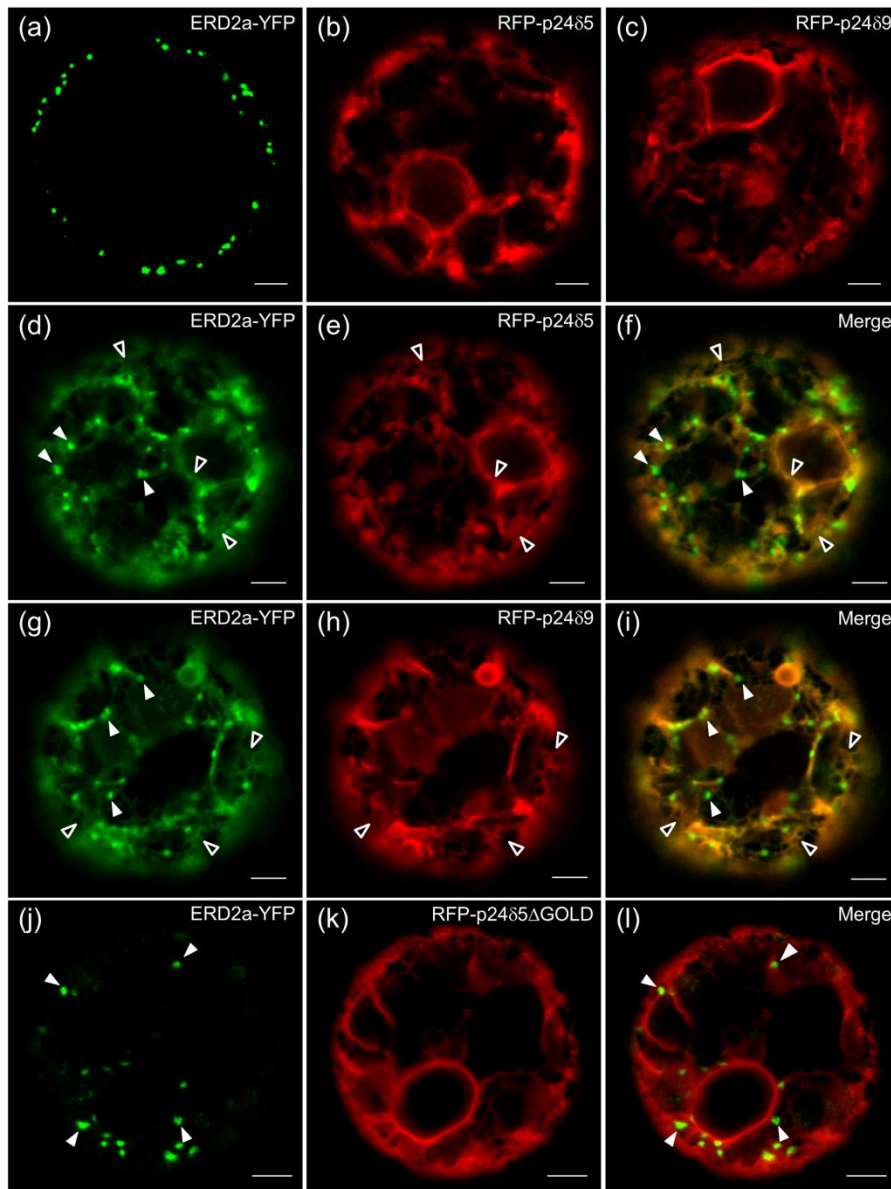


Figure 1. RFP-p24 δ 5 (but not RFP-p24 δ 5 Δ GOLD) and RFP-p24 δ 9 partially relocate ERD2a-YFP to the ER in tobacco protoplasts. Transient gene expression in tobacco mesophyll protoplasts. (a) ERD2a-YFP mainly localized to punctate Golgi structures. (b-c) RFP-p24 δ 5 (b) and RFP-p24 δ 9 (c) localized exclusively to the ER. (d-i) RFP-p24 δ 5 (e) and RFP-p24 δ 9 (h) caused a partial relocation of ERD2a-YFP (d and g) to the ER (open arrowheads), although ERD2a-YFP also showed a punctate localization (solid white arrowheads) (ER & Golgi localization) (merged images in f and i). (j-l) RFP-p24 δ 5 (Δ GOLD) (k) had no effect on the localization of ERD2a-YFP (j), which localized exclusively to punctate Golgi structures (solid white arrowheads) (merged image in l). Images included in the panels show the most representative pattern found for each condition according to the quantification shown in Figure 2. Scale bars = 5 μ m.

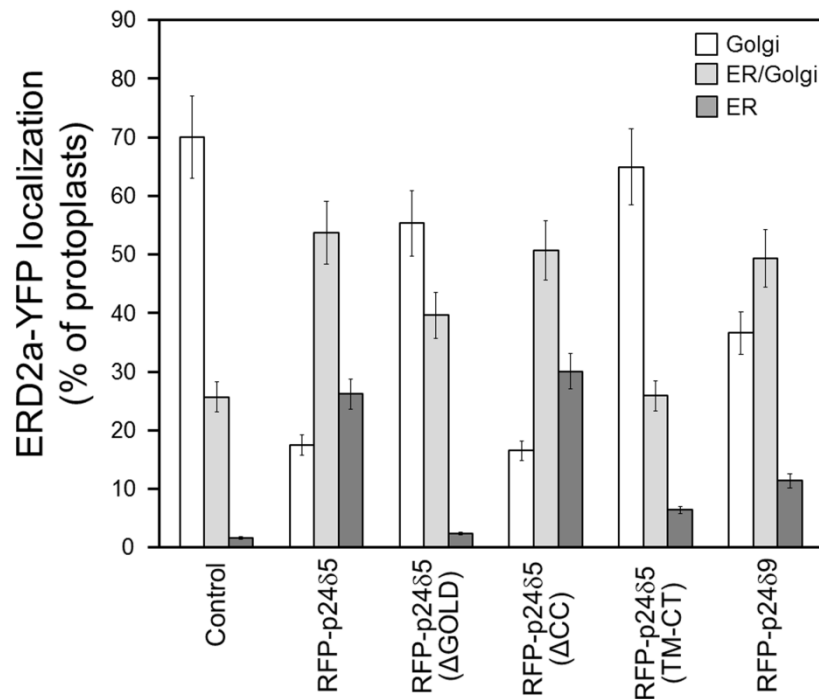


Figure 2. Quantification of the localization of ERD2a-YFP under different expression conditions. A significant number of protoplasts (from at least four independent experiments), showing comparable expression levels of ERD2a-YFP and RFP-p24δ5/9 (or mutant versions), were analyzed per condition, using identical laser output levels and imaging conditions. Number of protoplasts analyzed per condition: ERD2a-YFP (121); ERD2a-YFP + RFP-p24δ5 (167); ERD2a-YFP + RFP-p24δ5(ΔGOLD) (81); ERD2a-YFP + RFP-p24δ5(ΔCC) (94); ERD2a-YFP + RFP-p24δ5(TM-CT) (15); ERD2a-YFP + RFP-p24δ9 (77). The localization of ERD2a-YFP was assigned as Golgi, ER & Golgi or ER (see Figure 1 and Figure S1) and calculated as a percentage. Error bars represent SE of the mean.

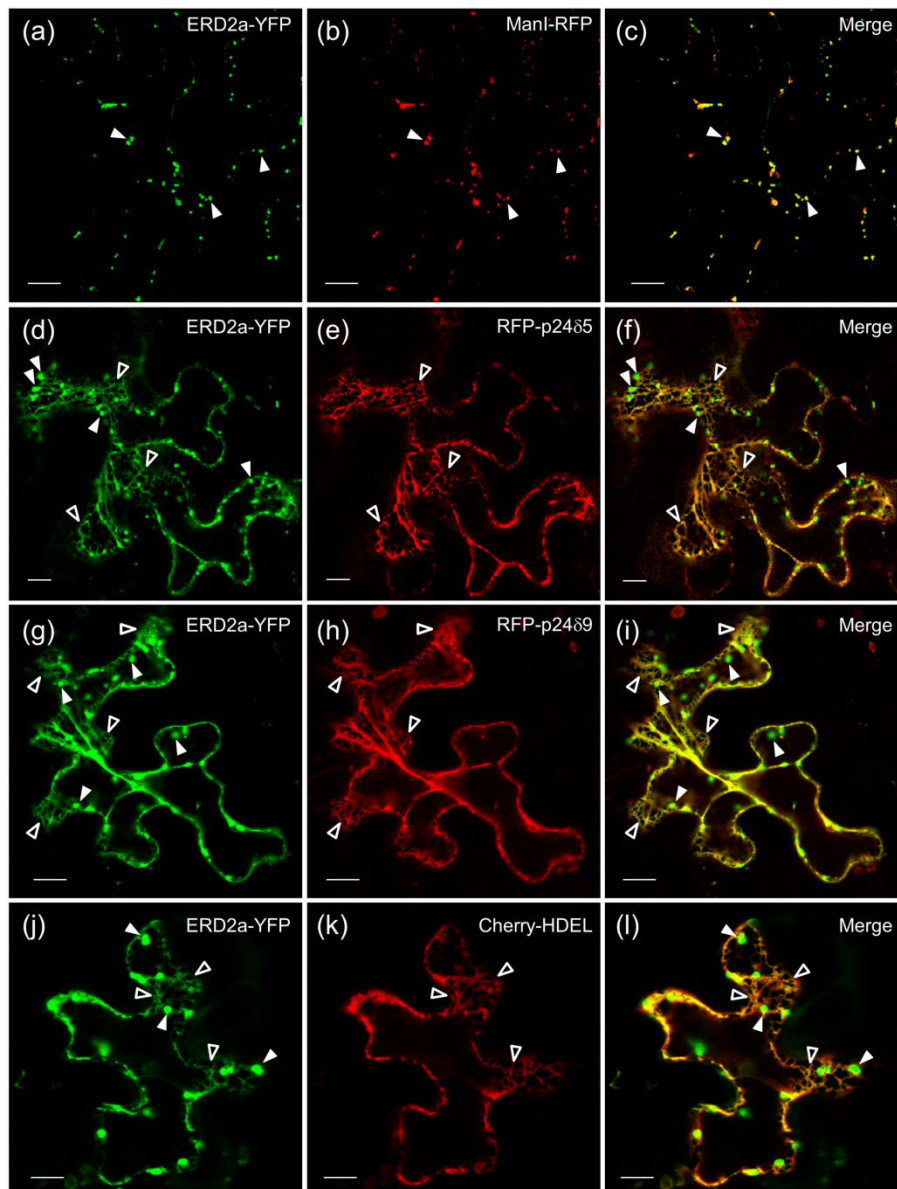


Figure 3. RFP-p24 δ 5/9 and cherry-HDEL partially relocalized ERD2a-YFP from the Golgi to the ER in tobacco leaf epidermal cells. Transient gene expression in tobacco leaf epidermal cells. (a-c) ERD2a-YFP (a) colocalized with ManI-RFP (b) in punctate Golgi structures (solid white arrowheads) (merged image in c). (d-i) RFP-p24 δ 5 (e) and RFP-p24 δ 9 (h) caused a partial relocalization of ERD2a-YFP (d and g) to the ER (open arrowheads), although ERD2a-YFP also showed a punctate Golgi localization (solid white arrowheads) (merged images in f and i). (j-l) Cherry-HDEL (k) also caused a partial relocalization of ERD2a-YFP (j) to the ER (open arrowheads), although ERD2a-YFP also showed a punctate Golgi localization (solid white arrowheads) (merged image in l). Scale bars = 10 μ m.

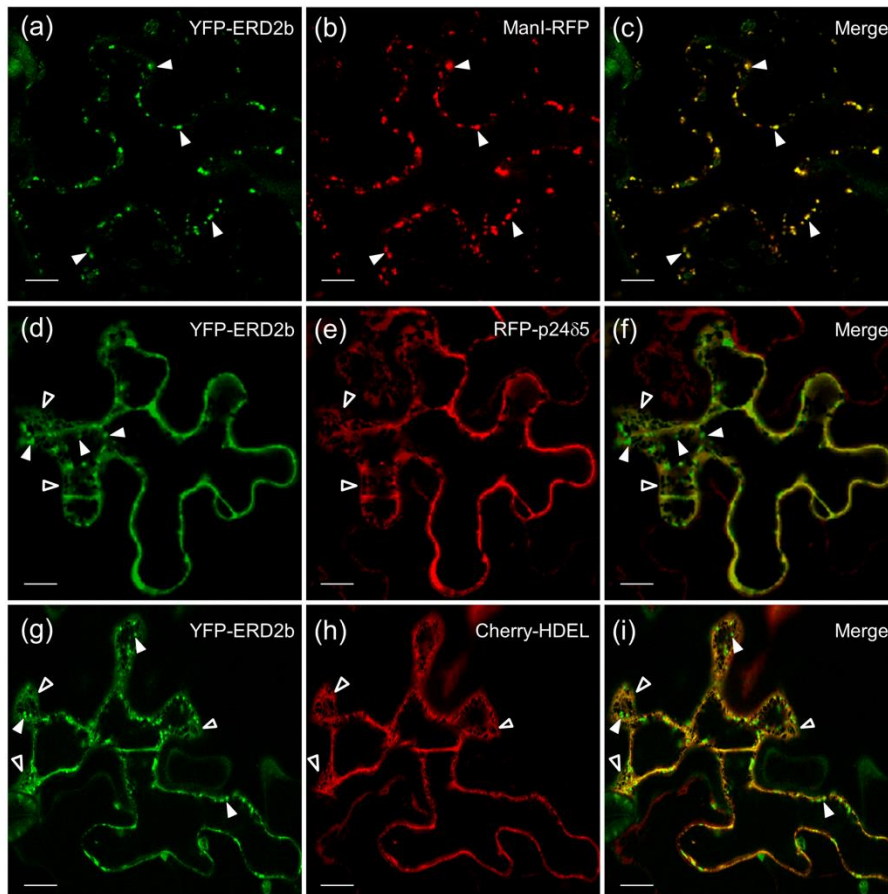


Figure 4. RFP-p24 δ 5 and cherry-HDEL partially relocated YFP-ERD2b from the Golgi to the ER in tobacco leaf epidermal cells. Transient gene expression in tobacco leaf epidermal cells. (a-c) YFP-ERD2b (a) colocalized with ManI-RFP (b) in punctate Golgi structures (solid white arrowheads) (merged image in c). (d-f) RFP-p24 δ 5 (e) caused a partial relocation of YFP-ERD2b (d) to the ER (open arrowheads), although YFP-ERD2b also showed a punctate Golgi localization (solid white arrowheads) (merged image in f). (g-i) Cherry-HDEL (h) also caused a partial relocation of YFP-ERD2b (g) to the ER (open arrowheads), although YFP-ERD2b also showed a punctate Golgi localization (solid white arrowheads) (merged image in i). Scale bars = 10 μ m.

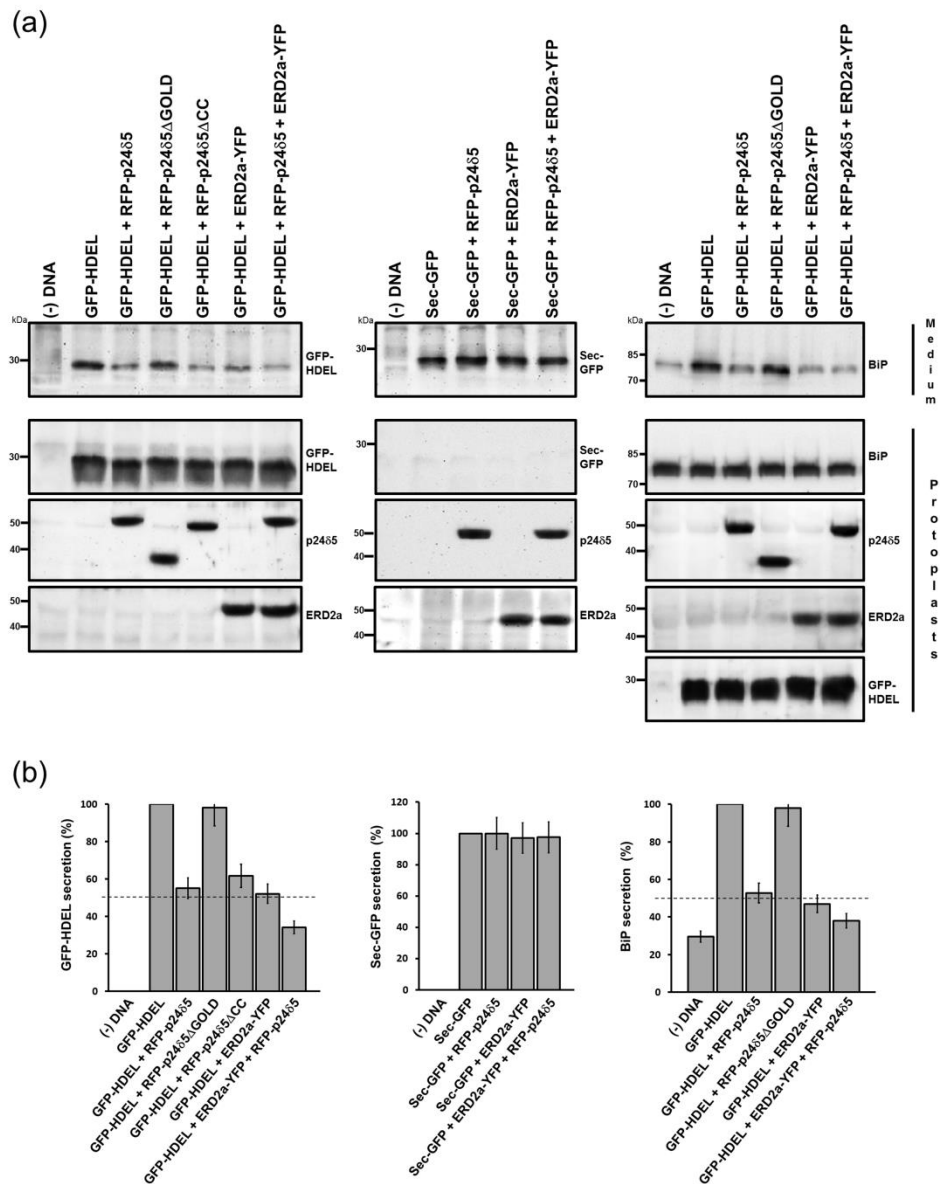


Figure 5. Secretion assays. (a) Tobacco mesophyll protoplasts were transfected with the indicated constructs and incubated for 20 h. Total proteins from protoplasts and culture medium (concentrated 5x by methanol/chloroform precipitation), were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against GFP (to detect GFP-HDEL, Sec-GFP or ERD2a-YFP), RFP (to detect RFP-p24 δ 5) or BiP. Notice the difference in molecular weight between wild-type RFP-p24 δ 5 and deletion mutants lacking either the GOLD or the coiled-coil (CC) domain. (b) Quantification from three independent experiments as the ones shown in panel (a), with duplicated samples. Secretion of GFP-HDEL, Sec-GFP or BiP under different conditions of co-expression was calculated as a percentage of the secretion of these markers when expressed alone.

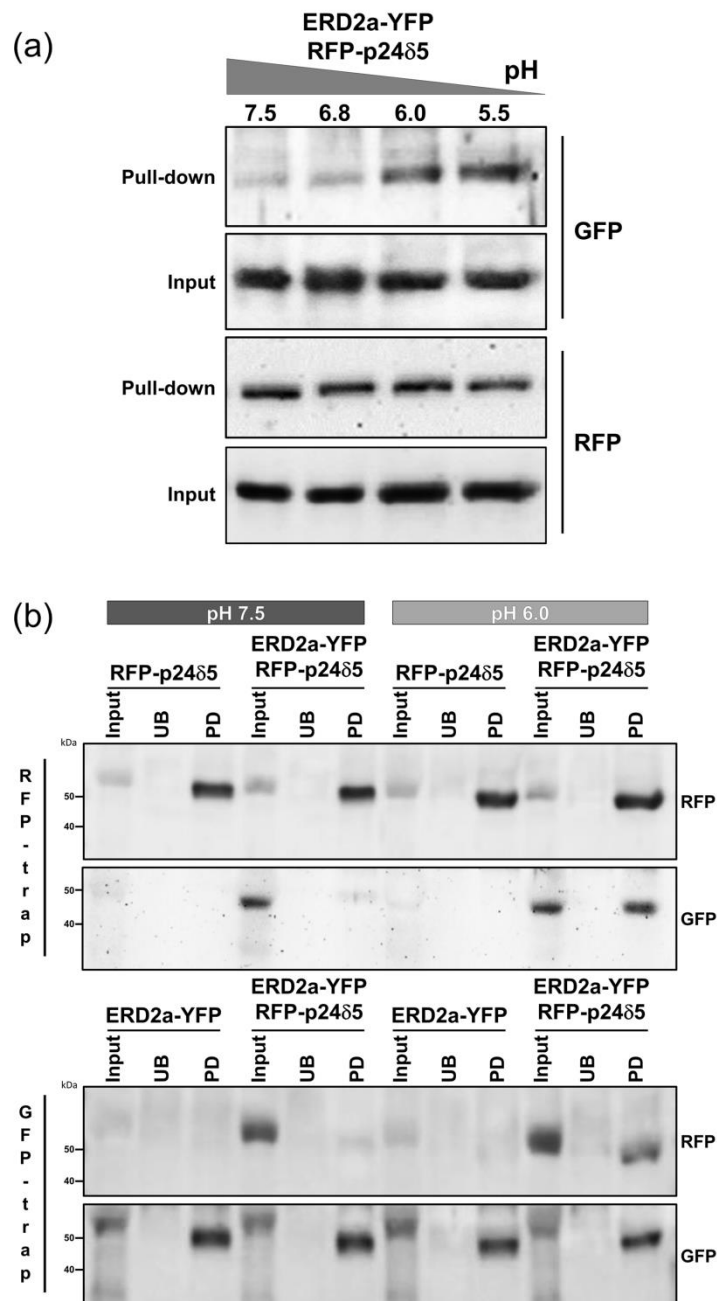


Figure 6. p24 δ 5 interacts with ERD2a in a pH-dependent manner. (a) Pull-down of RFP-p24 δ 5 from PNS of protoplasts co-expressing RFP-p24 δ 5 and ERD2a-YFP at different pH values ranging from 5.5 to 7.5 using a RFP-trap. (b) Pull-down of RFP-p24 δ 5 (RFP-trap, top panel) from PNS of protoplasts expressing RFP-p24 δ 5 with or without ERD2a-YFP or of ERD2a-YFP (GFP-trap, lower panel) from PNS of protoplasts expressing ERD2a-YFP with or without RFP-p24 δ 5, both at pH 6.0 or at pH 7.5. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against RFP (to detect RFP-p24 δ 5) or GFP (to detect ERD2a-YFP). Input: 5 % of the PNS used for the pull-down assay. UB: unspecific binding (using blocked magnetic particles). PD: pull-down.

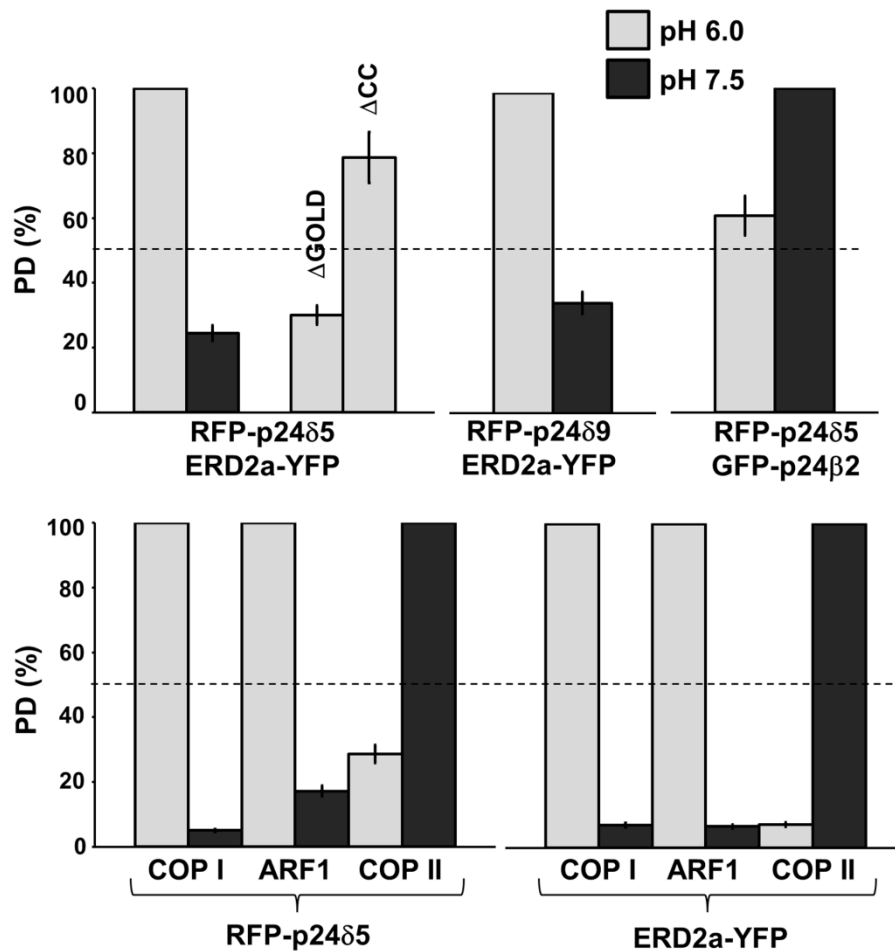


Figure 7. Quantification of the biochemical interactions in pull-down experiments. Upper panels. In experiments using the RFP-trap (Figures 6, 8, 9 and S5), the amount of GFP-labeled interacting protein (PD, pull-down) was normalized to the amount of RFP-labeled protein bound to the beads, although the latter was consistently similar in the different points of the same experiment (as it was the case with the inputs). The opposite was done when using the GFP-trap (Figures 6, 8 and 9). When the interaction was monitored both using the RFP-trap and the GFP trap, we obtained the average between both values. When comparing the interactions between pH 7.5 and pH 6.0, the higher value was set to 100 and the other one was expressed as a percentage. Lower panels. The same strategy of quantification was performed for the pull-down experiments shown in Figure 11. Error bars represent SE of the mean from at least three independent experiments.

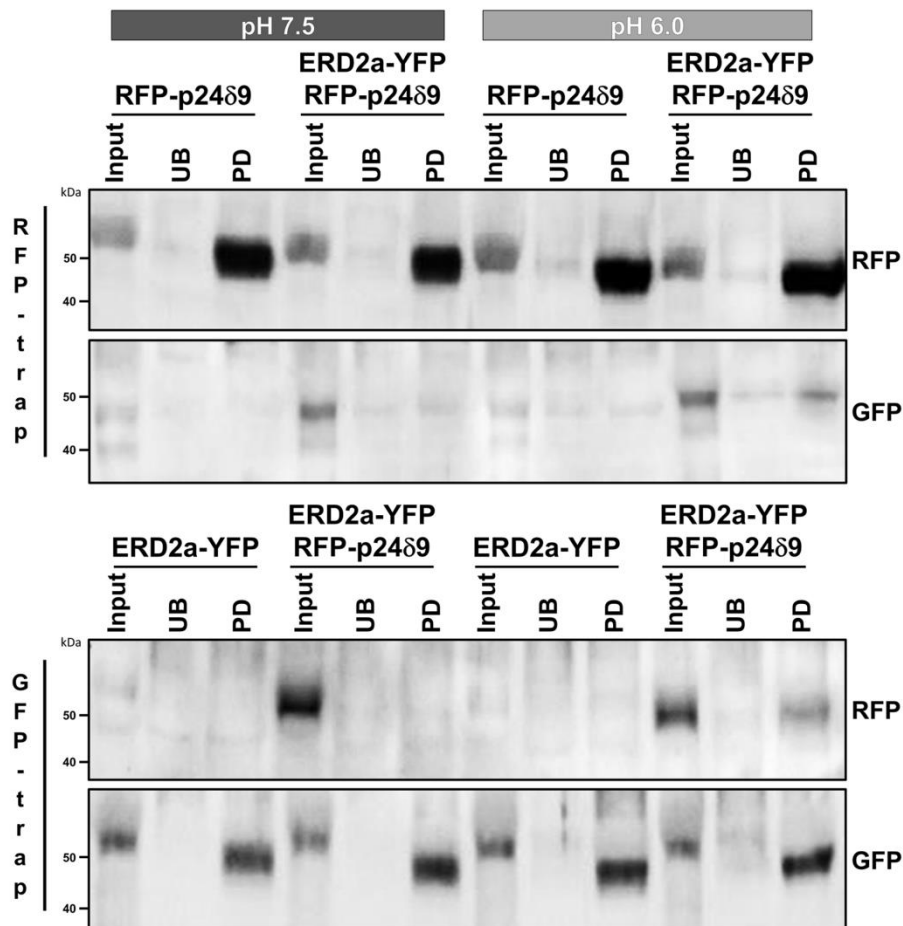


Figure 8. p24 δ 9 also interacts with ERD2a in a pH-dependent manner. (a) Pull-down of RFP-p24 δ 9 from PNS of protoplasts expressing RFP-p24 δ 9, with or without ERD2a-YFP, using a RFP-trap at pH 6.0 or at pH 7.5. (b) Pull-down of ERD2a-YFP from PNS of protoplasts expressing ERD2a-YFP with or without RFP-p24 δ 9, using a GFP-trap at pH 6.0 or at pH 7.5. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against RFP (to detect RFP-p24 δ 9) or GFP (to detect ERD2a-YFP). Input: 5 % of the PNS used for the pull-down assay. UB: unspecific binding (using blocked magnetic particles). PD: pull-down.

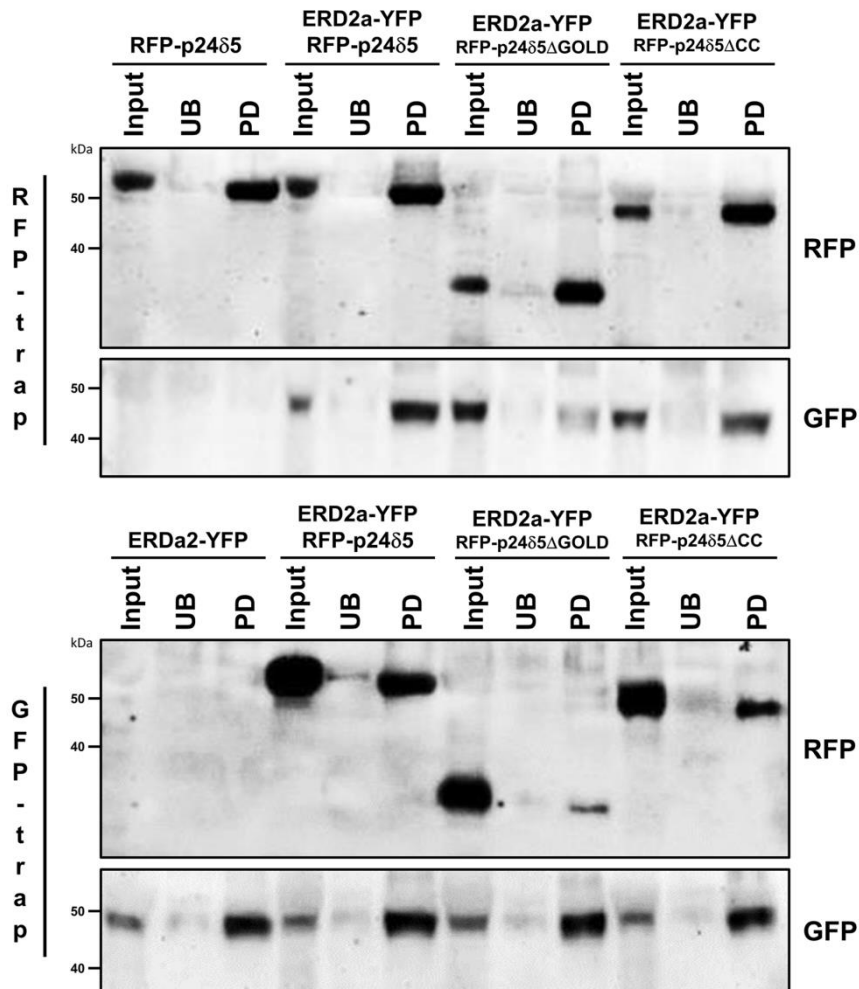


Figure 9. Interaction between RFP-p24 δ 5 and ERD2a-YFP requires the GOLD domain in p24 δ 5. (a) Pull-down of RFP-p24 δ 5 or mutant versions from PNS of protoplasts expressing these proteins and ERD2a-YFP, using a RFP-trap at pH 6.0. As a control, we used PNS of protoplasts expressing only RFP-p24 δ 5. (b) Pull-down of ERD2a-YFP from PNS of protoplasts expressing ERD2a-YFP and RFP-p24 δ 5 or mutant versions, using a GFP-trap at pH 6.0. As a control, we used PNS of protoplasts expressing only ERD2a-YFP. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against RFP (to detect RFP-p24 δ 5 or mutant versions) or GFP (to detect ERD2a-YFP). Notice the difference in molecular weight between wild-type RFP-p24 δ 5 and deletion mutants lacking either the GOLD or the coiled-coil (CC) domain. Input: 5 % of the PNS used for the pull-down assay. UB: unspecific binding (using blocked magnetic particles). PD: pull-down.

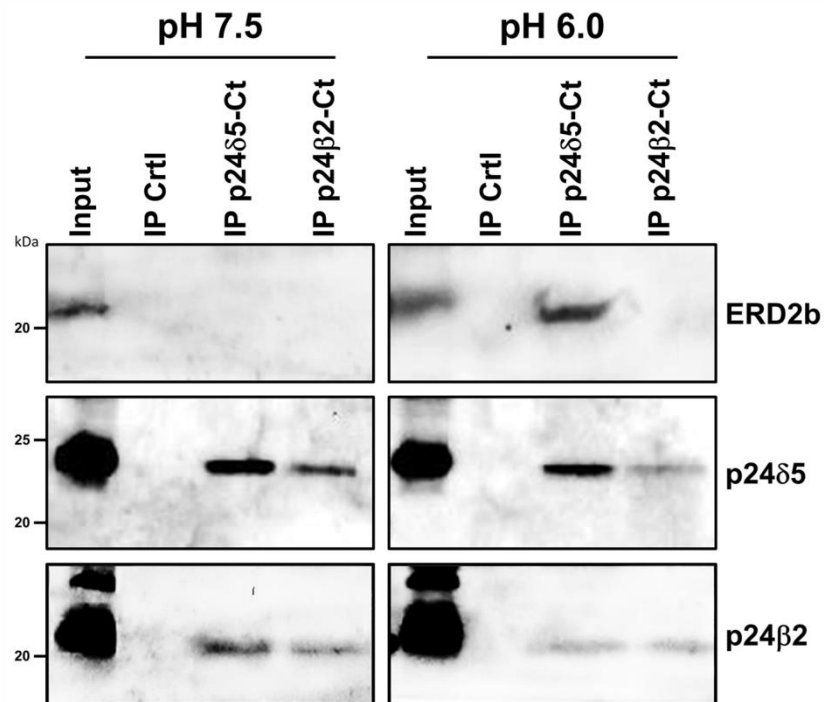


Figure 10. Endogenous p24 δ 5 (but not p24 β 2) interacts with ERD2b in a pH-dependent manner.

Immunoprecipitation of endogenous p24 proteins in Arabidopsis cell suspension cultures was performed using affinity purified antibodies against the Ct- of p24 β 2 (IP p24 β 2-Ct) or p24 δ 5 (IP p24 δ 5-Ct). As a control, we used control beads (IP Ctrl). Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and Western blot with antibodies against ERD2b, p24 δ 5 (N-terminal) or p24 β 2 (C-terminal). Input: 20 μ g of the membrane proteins used as input for the immunoprecipitation.

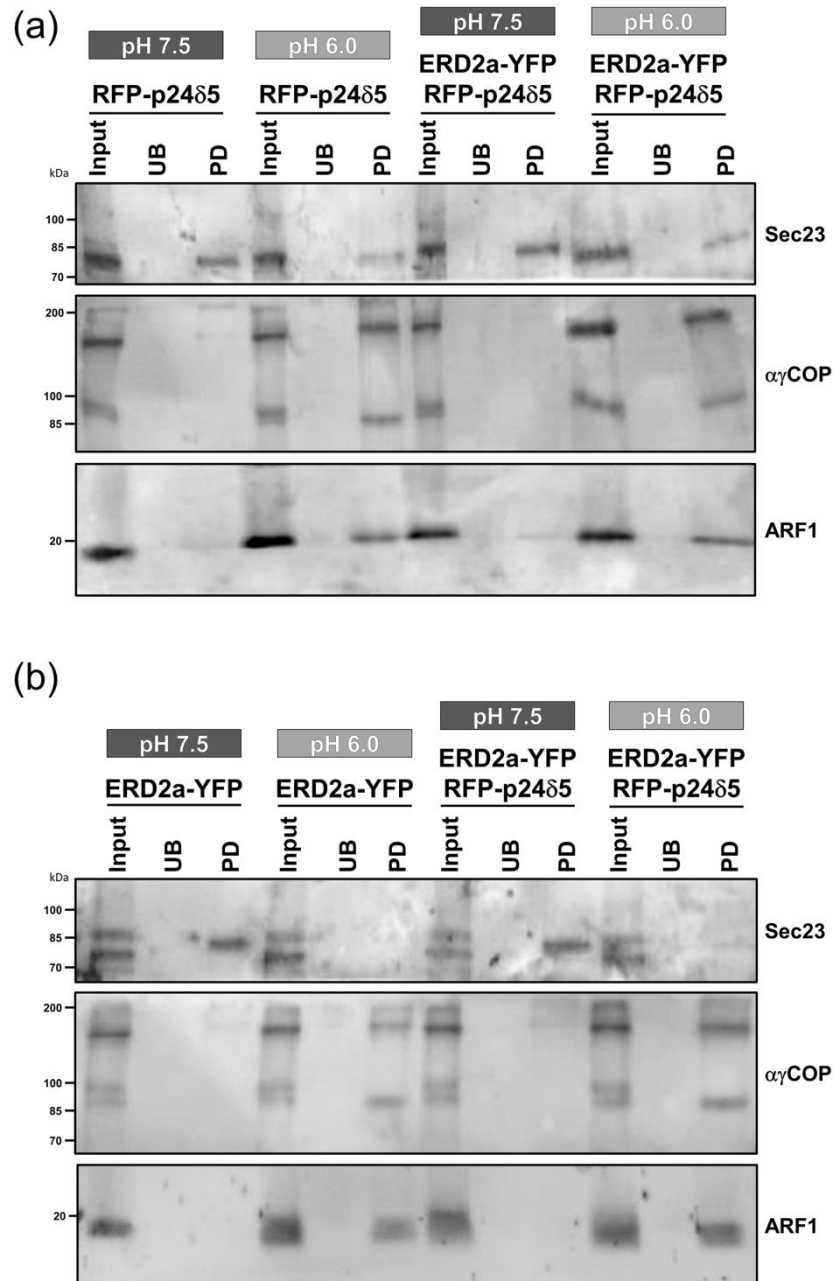


Figure 11. Both p24 δ 5 and ERD2a interact with ARF1 and COPI/COPII subunits in a pH-dependent manner. (a) Pull-down of RFP-p24 δ 5 from PNS of protoplasts expressing RFP-p24 δ 5, with or without and ERD2a-YFP, using a RFP-trap at pH 6.0 or at pH 7.5. (b) Pull-down of ERD2a-YFP from PNS of protoplasts expressing ERD2a-YFP with or without RFP-p24 δ 5, using a GFP-trap at pH 6.0 or at pH 7.5. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against Sec23, α/γ -COP or ARF1. Input: 5 % of the PNS used for the pull-down assay. UB: unspecific binding (using blocked magnetic particles). PD: pull-down.

SUPPLEMENTAL FIGURES

Figure S1. Alternative patterns obtained for ERD2-YFP upon co-expression with RFP-p24 δ 5.

Figure S2. RFP-p24 δ 5 Δ CC, but not RFP-p24 δ 5 (TM-CT), partially relocalizes ERD2-YFP to the ER.

Figure S3. Secretion assays in protoplasts.

Figure S4. p24 δ 5 interacts with ERD2 in a pH-dependent manner (PNS versus membranes).

Figure S5. Negative controls for pull-down experiments.

Figure S6. Interaction between RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 is also pH-dependent.

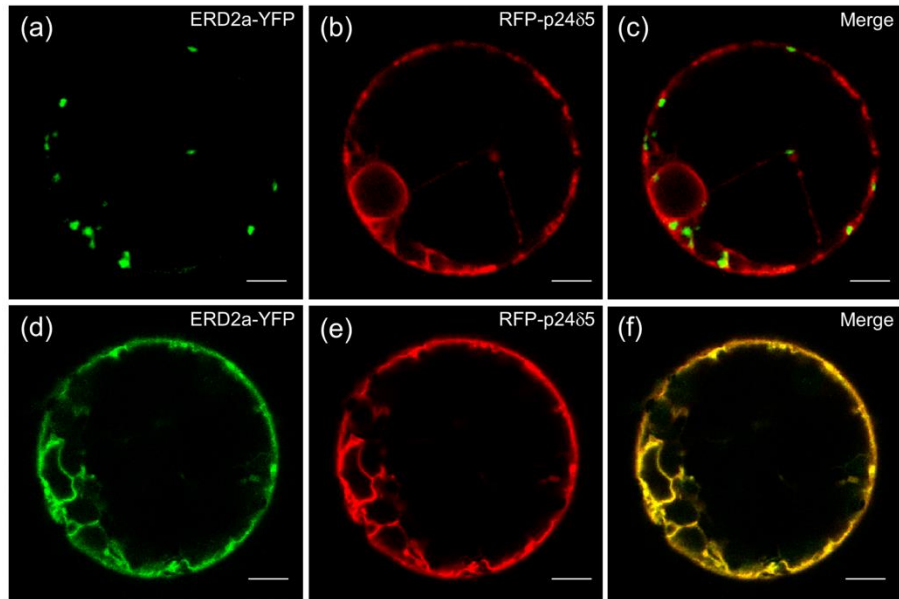


Figure S1. Alternative patterns obtained for ERD2a-YFP upon co-expression with RFP-p24 δ 5. (a-c) Punctate (Golgi) pattern. (d-f) ER pattern.

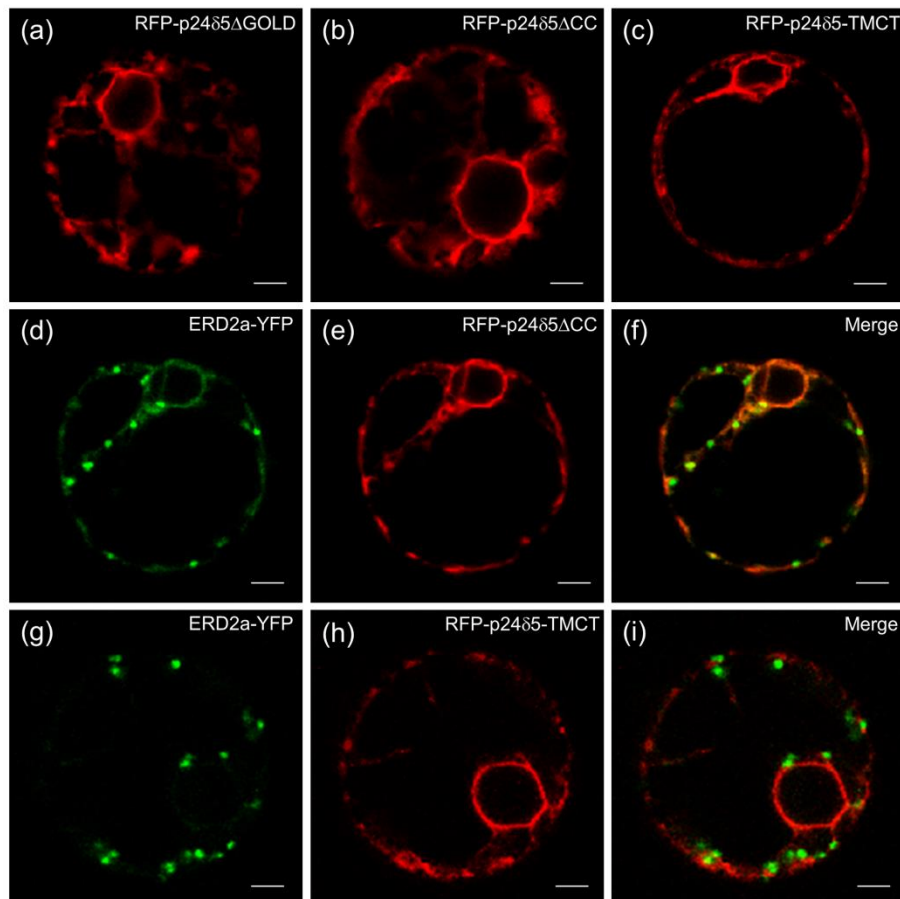


Figure S2. RFP-p24 δ 5 Δ CC, but not RFP-p24 δ 5 (TM-CT), partially relocalizes ERD2a-YFP to the ER. (a) RFP-p24 δ 5 Δ GOLD. (b) RFP-p24 δ 5 Δ CC. (c) RFP-p24 δ 5 (TM-CT). (d-f) RFP-p24 δ 5 Δ CC (e) caused a partial relocalization of ERD2a-YFP (d) to the ER, although ERD2a-YFP also showed a punctate localization (ER & Golgi localization) (merged image in f). (g-i) RFP-p24 δ 5 (TM-CT) (h) had no effect on the localization of ERD2a-YFP (g) (merged image in i). Images included in the panels show the most representative pattern found for each condition according to the quantification shown in Figure 2. Scale bars = 5 μ m.

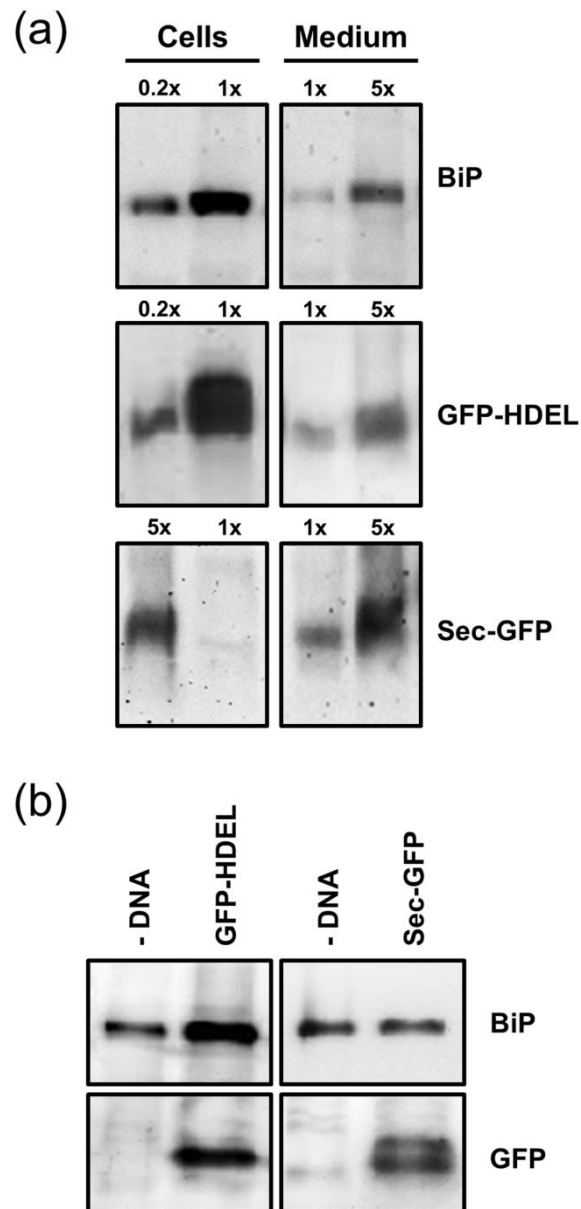


Figure S3. Transport assays in protoplasts. (a) Tobacco mesophyll protoplasts were transfected with GFP-HDEL (medium panel), Sec-GFP (lower panel) or in the absence of DNA (top panel) and incubated for 20 h. Total proteins from protoplast extracts (Cells) and culture medium were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against BiP (top panel) or GFP (to detect GFP-HDEL or Sec-GFP, medium and lower panels). Where indicated, a lower amount of cells (0.2 x) was also loaded. Medium was also concentrated 5x by methanol/chloroform precipitation, as we did for cells transfected with the Sec-GFP construct. (b) Tobacco mesophyll protoplasts were transfected with GFP-HDEL or Sec-GFP and incubated for 20 h. Total proteins from the medium (5x concentrated) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against BiP (top panel) or GFP (to detect GFP-HDEL or Sec-GFP). GFP-HDEL, but not Sec-GFP induced increased secretion of BiP. 2

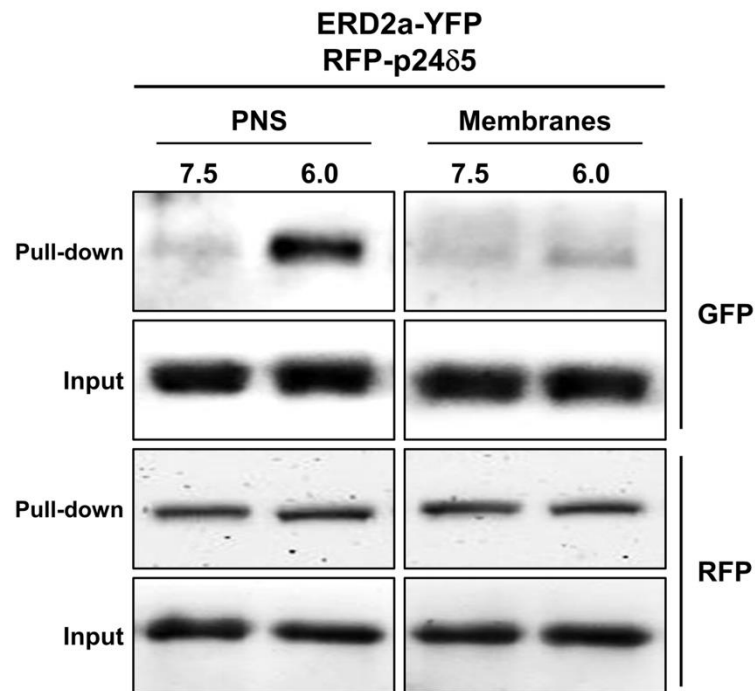


Figure S4. p24 δ 5 interacts with ERD2a in a pH-dependent manner (PNS versus membranes). Pull-down of RFP-p24 δ 5 from a post-nuclear supernatant (PNS) or a membrane fraction of protoplasts expressing RFP-p24 δ 5 and ERD2a-YFP, using a RFP-trap at pH 6.0 or at pH 7.5. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against RFP (to detect RFP-p24 δ 5) or GFP (to detect ERD2a-YFP). Input: 5 % of the PNS used for the pull-down assay.

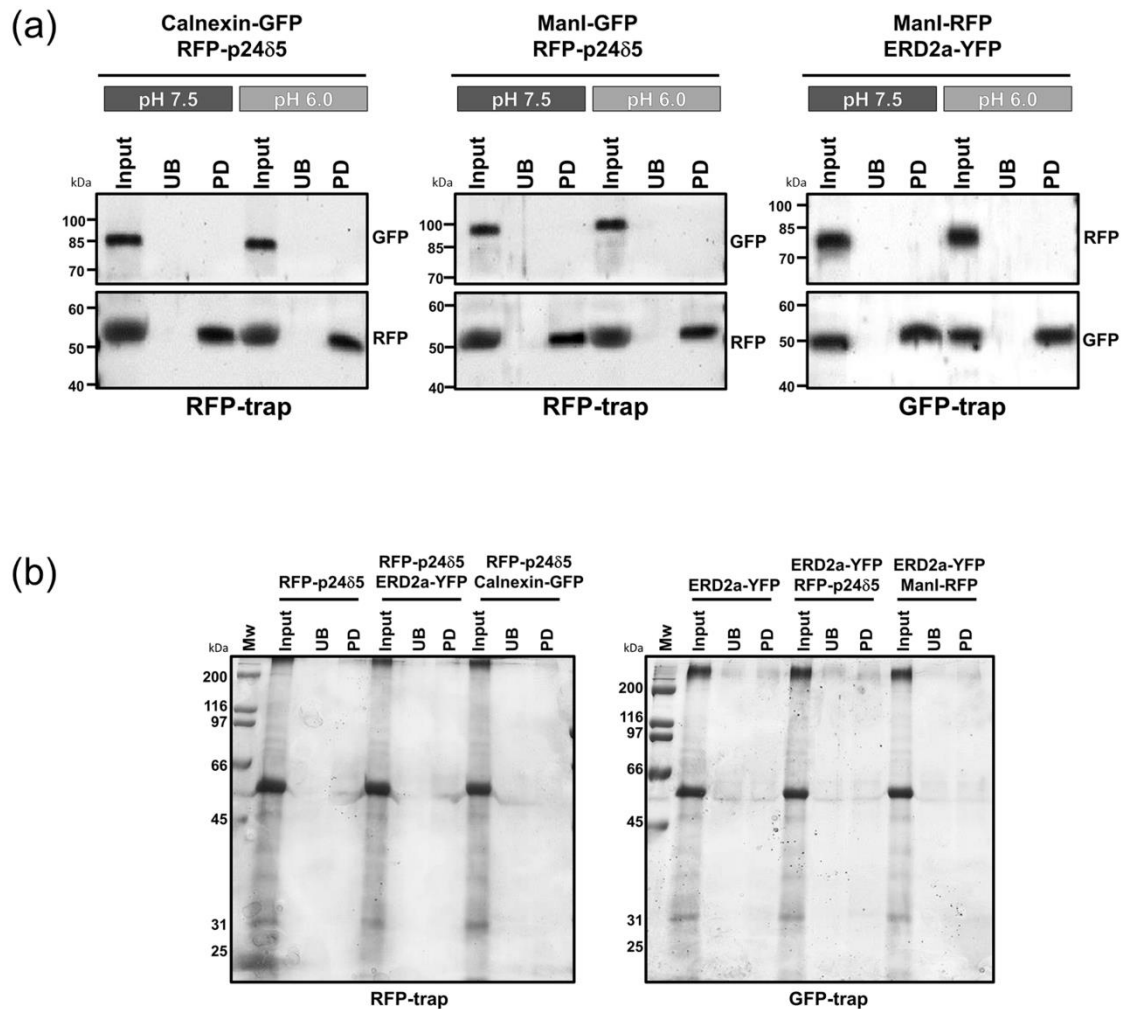


Figure S5. Negative controls for pull-down experiments. (a) Pull-down of RFP-p24 δ 5 (RFP-trap, left two panels) or ERD2a-YFP (GFP-trap, right panel) from PNS of protoplasts co-expressing the indicated proteins, both at pH 6.0 or at pH 7.5. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against RFP (to detect RFP-p24 δ 5 or ManI-RFP) or GFP (to detect ERD2a-YFP, calnexin-GFP or ManI-GFP). (b) Pull-downs of RFP-p24 δ 5 (RFP-trap, left panel) or ERD2a-YFP (GFP-trap, right panel) from PNS of protoplasts co-expressing the indicated proteins at pH 7.5. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. Input: 5 % of the PNS used for the pull-down assay. UB: unspecific binding (using blocked magnetic particles). PD: pull-down.

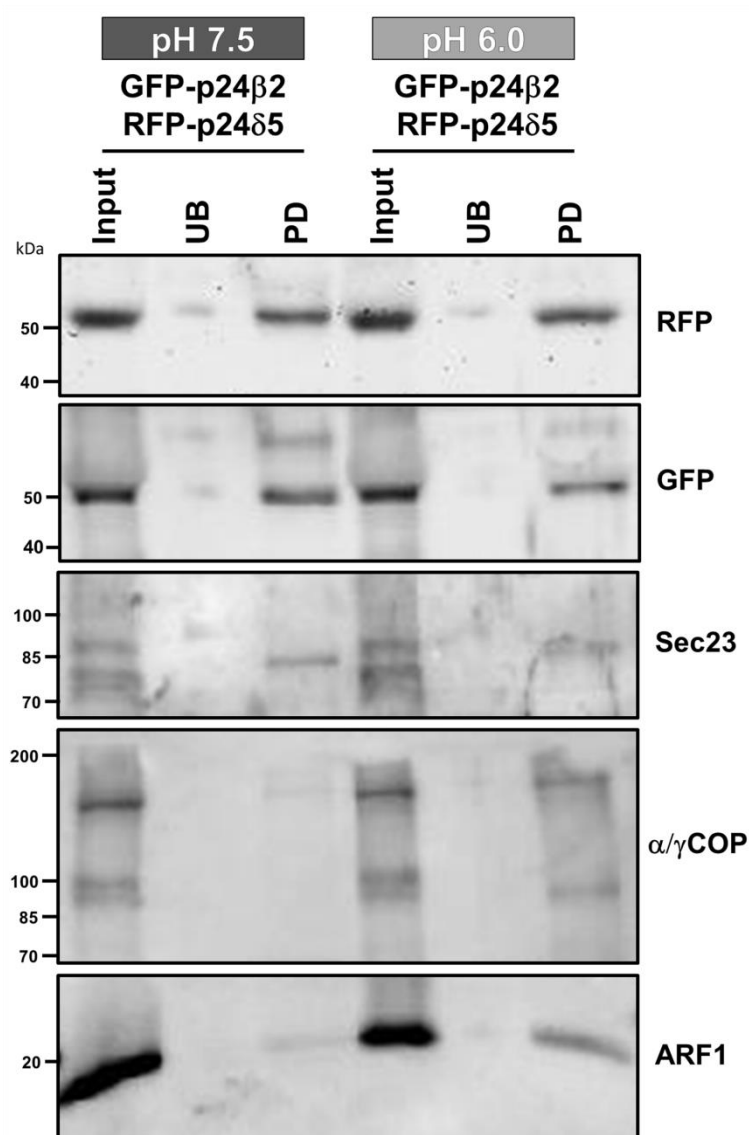


Figure S6. Interaction between RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 is also pH-dependent. Pull-down of RFP-p24 δ 5 from PNS of protoplasts co-expressing RFP-p24 δ 5 and GFP-p24 β 2 using a RFP-trap both at pH 6.0 or at pH 7.5. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with antibodies against RFP (to detect RFP-p24 δ 5), GFP (to detect GFP-p24 β 2), Sec23, α / γ -COP or ARF1. Input: 5 % of the PNS used for the pull-down assay. UB: unspecific binding (using blocked magnetic particles). PD: pull-down.

DISCUSIÓN GENERAL

1. LA FAMILIA p24 DE PLANTAS

La familia p24 es una familia de proteínas de membrana pequeñas, de 20-25 kDa, cuya localización y función en plantas eran hasta el momento desconocidas.

Esta familia de proteínas p24 se divide en 4 subfamilias: p24 α , p24 β , p24 δ y p24 γ . En animales y hongos existen representantes de cada una de las cuatro subfamilias. Sin embargo, las plantas sólo poseen representantes de las subfamilias p24 β y p24 δ . En concreto, en *Arabidopsis thaliana* existen 9 miembros de la subfamilia p24 δ (p24 δ 3- δ 11) y 2 miembros de la subfamilia p24 β (p24 β 2 y p24 β 3).

Dentro de la subfamilia p24 δ pueden distinguirse 2 subclases, p24 δ -1 y p24 δ -2 (Chen et al., 2012). Actualmente no existen datos que sugieran diferencias funcionales entre ambas subclases, aunque p24 δ 5 (subclase p24 δ -1) y p24 δ 9 (subclase p24 δ -2) presentan algunas diferencias en cuanto a su tráfico en la vía secretora temprana (ver apartado siguiente). Actualmente se está investigando en nuestro laboratorio la presencia en las proteínas de la subclase p24 δ -1 de una diana de glicosilación que no está presente en las proteínas de la subclase p24 δ -2. En cualquier caso, es muy probable que exista redundancia funcional entre los miembros de la subfamilia p24 δ , o al menos, entre los miembros de cada una de las dos subclases.

De acuerdo con las bases de datos públicas de expresión génica, 5 de de las 11 proteínas p24 de *Arabidopsis* (p24 δ 4, p24 δ 5, p24 δ 9, p24 β 2 y p24 β 3) tienen niveles medios/altos de expresión en diferentes tejidos. Por el contrario, otros miembros de la subfamilia p24 δ (p24 δ 6 y p24 δ 11) tienen niveles de expresión bajos y/o específicos de tejido (Zimmermann et al., 2004). Por tanto, es posible que los miembros de la primera categoría, con niveles de expresión medio/altos, pudieran realizar funciones más generales (“housekeeping”), probablemente relacionadas con el mantenimiento de los compartimentos de la vía secretora, mientras que las proteínas de la segunda categoría, con expresión más reducida, podrían tener funciones más específicas de tejido.

2. LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS p24

La proteínas de la familia p24 se descubrieron hace ya algún tiempo, y existen numerosos estudios referentes a su localización y tráfico en mamíferos y levaduras. Sin embargo, solo recientemente se han empezado a descubrir algunas de sus funciones en

mamíferos, siendo éstas altamente dependientes de su localización. Por ello, el primer objetivo para investigar posibles funciones de estas proteínas en plantas fue elucidar su tráfico y localización.

Para determinar la localización de las proteínas p24 endógenas se han utilizado anticuerpos frente los extremos N- y C-terminal de las proteínas p24 δ 5 y p24 β 2; y frente al extremo N-terminal de las proteínas p24 δ 9 y p24 β 3. En contraste con el extremo N-terminal, que difiere de forma significativa entre los diferentes miembros de la familia, el extremo C-terminal es muy similar entre los miembros de la subfamilia p24 δ (Figura 15). Por ello, supusimos que los anticuerpos N- y C-terminales tendrían diferente especificidad. De hecho, utilizando los mutantes simples *p24 δ 5-1* y *p24 δ 4-1*, y el doble mutante *p24 δ 4 δ 5*, pudimos concluir que el anticuerpo C-terminal de p24 δ 5 reconoce tanto a la proteína p24 δ 5 como a p24 δ 4, a diferencia del anticuerpo p24 δ 5-Nt, que solo reconoce a la proteína p24 δ 5, pero no a p24 δ 4.

La localización de las proteínas p24 endógenas de la subfamilia p24 δ (p24 δ 4, p24 δ 5, de la subfamilia p24 δ -1; y p24 δ 9, de la subfamilia p24 δ -2) resultó ser mayoritariamente en el ER, aunque también se observaba algo de localización en la región del *cis*-Golgi o en vesículas COPI putativas. Esto está en concordancia con los resultados que se podrían esperar atendiendo a las características de la cola C-terminal citoplasmática de los miembros de esta subfamilia, la cual presenta un motivo de di-lisina en posición (-3,-4), óptima para su unión a componentes de la cubierta COPI (Contreras et al., 2004a). Además, la cooperatividad que muestra el motivo di-aromático en p24 δ 5, potenciando la unión de COPI al motivo de di-lisina hace que la proteína p24 δ 5 presente una mayor afinidad por la cubierta COPI, lo que aumentaría la eficiencia de su transporte retrógrado Golgi-ER (Contreras et al., 2004b). La localización mayoritaria en el ER de las proteínas p24 δ es consistente con la localización ya demostrada para las proteínas p24 α de mamíferos, que presentan las mismas características en la cola C-terminal que las proteínas p24 δ de *Arabidopsis*, y las cuales eran las únicas que además de localizarse en el *cis*-Golgi y en el ERGIC, presentaban una localización extensiva en el ER (Wada et al., 1991; Dominguez et al., 1998; Lavoie et al., 1999; Marzioch et al., 1999; Emery et al., 2000; Emery et al., 2003)

La localización de los dos miembros de la subfamilia p24 β (p24 β 2 y p24 β 3) mostró que las proteínas p24 β endógenas se localizaban principalmente en el aparato de Golgi, y más concretamente en regiones del *cis*-Golgi, aunque también se observó una localización parcial en el ER. Esta localización concuerda con la localización de otras proteínas p24 β de mamíferos

(Dominguez et al., 1998; Blum et al., 1999; Gommel et al., 1999; Emery et al., 2000) y de levaduras (Schimmoller et al., 1995; Belden and Barlowe, 2001). Esta subfamilia, a diferencia de la subfamilia p24 δ , no presenta aparentemente ningún motivo de unión a los componentes de la cubierta COPI, pero sí presenta un motivo di-aromático que podría estar facilitando su salida desde el ER a través de vesículas recubiertas por COPII. Por tanto, la localización de las proteínas p24 de *Arabidopsis* depende de las señales de clasificación en su cola citosólica C-terminal.

Mediante ensayos de **localización de proteínas p24 *in vivo***, utilizando proteínas marcadas con un fluoróforo y expresión transitoria en protoplastos de tabaco y *A.thaliana*, y en hojas de *N. benthamiana*, se ha comprobado que en estado estacionario, p24 δ 5 y p24 δ 9 se localizan exclusivamente en el ER (y no en el complejo de Golgi), mientras que p24 β 2 y p24 β 3 se localizan mayoritariamente en el complejo de Golgi (y no en el ER).

Las pequeñas diferencias observadas entre la localización de las proteínas p24 endógenas y las expresadas transitoriamente de forma individual nos sugiere que la localización de las proteínas p24 endógenas depende no solo de los determinantes estructurales presentes en las proteínas p24 individuales, sino también de las interacciones con otras proteínas p24, como se ha demostrado en la presente Tesis y se discute más adelante (apartado 4).

Además, dichas interacciones influyen sobre la estabilidad de las proteínas p24, en particular las de la subfamilia p24 β , ya que las proteínas de la subfamilia p24 δ son relativamente estables. Solo existía un trabajo previo sobre los mecanismos de degradación de proteínas p24. En dicho trabajo, la proteína TMP21 (también llamada p23, subfamilia p24 δ) mostraba una semivida muy corta, de menos de 3 horas, y seguía una ruta de degradación a través del proteasoma. Mientras que el tratamiento con MG-132 aumentaba significativamente los niveles de esta proteína, el tratamiento con inhibidores de cisteín proteasas (E-64) carecía de efecto (Liu et al., 2008). Hasta el momento no existía ningún estudio de estabilidad para proteínas de la subfamilia p24 β . En este trabajo se observó, que de manera diferencial a la proteína TMP21 (p24 δ), las proteínas p24 β de *Arabidopsis* parecen ser degradadas por cisteín proteasas y no por el proteasoma, probablemente como consecuencia de su transporte hasta el PVC y la vacuola.

3. TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS p24

Para el estudio del tráfico de estas proteínas p24 se han utilizado construcciones de estas proteínas p24 (y sus versiones mutantes) unidas a proteínas fluorescentes (GFP o RFP) en su extremo N-terminal. Las proteínas fluorescentes se situaron entre la secuencia señal (en el extremo N-terminal, y que va a ser eliminada) y la región luminal N-terminal de la proteína p24 nativa. Esta estrategia se ha demostrado que refleja fielmente la dinámica de tráfico y el patrón de localización de las proteínas p24 (Blum et al., 1999; Barr et al., 2001; Majoul et al., 2001; Gupta and Swarup, 2006; Simpson et al., 2006; Blum and Lepier, 2008).

Sin embargo, otros autores ignoraron la posible influencia de la localización de la etiqueta fluorescente sobre la localización en estado estacionario de estas proteínas p24 (Chen et al., 2012). Estos autores unieron la etiqueta fluorescente al extremo C-terminal de las proteínas p24, y mostraron algunas discrepancias significativas con nuestros resultados. El hecho de que la etiqueta se localice en el extremo C-terminal, región citosólica muy corta de las proteínas p24, y que es la que posee las señales de unión para COPI y COPII, puede alterar de manera muy significativa la unión de estas proteínas a las cubiertas COPI y COPII, y por tanto alterar sus patrones de dinámica y localización. De hecho, se ha demostrado que la posición del motivo de di-lisina en (-3, -4) es esencial para la unión de COPI. Incluso cuando se sitúa en (-4,-5), como en p23, la unión de COPI es menos eficiente (Teasdale and Jackson, 1996). Por ello es difícil de imaginar que la adición de GFP en dicho extremo C-terminal carezca de efecto sobre el tráfico de las proteínas de fusión. Por esta razón, en otros trabajos con proteínas p24 de mamíferos se ha utilizado la localización N-terminal de las proteínas fluorescentes (Blum et al., 1996; Majoul et al., 2001; Simpson et al., 2006; Blum and Lepier, 2008), así como en trabajos previos en nuestro grupo de investigación (Langhans et al., 2008).

3.1. TRANSPORTE DE PROTEÍNAS p24 EN LA VÍA SECRETORA TEMPRANA: VESÍCULAS COPI Y COPII

Se ha propuesto que la localización en estado estacionario de las proteínas p24 dentro de la vía secretora temprana es el resultado de su transporte bidireccional entre ER y Golgi. En el caso de las proteínas p24 de la subfamilia p24 δ , poseen señales en su cola citosólica de unión tanto para COPI como para COPII (Contreras et al., 2004a; Contreras et al., 2004b).

Para estudiar los procesos de tráfico en la vía secretora temprana, utilizamos de dos tipos de estrategias: la utilización del mutante ARF1 (Q71L), en el cual está inhibida la formación de vesículas COPI y por tanto el transporte de retorno desde el Golgi hasta el ER (Pimpl et al., 2003); y la sobreexpresión de la proteína Sec12, que produce un secuestro de las proteínas Sar1 y por tanto una inhibición en la formación de vesículas recubiertas por COPII para el transporte anterógrado ER-Golgi (Phillipson et al., 2001) (Figura 17).

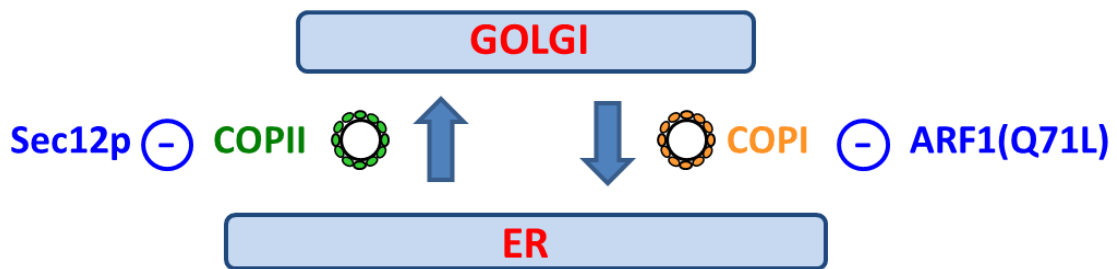


Figura 17. Inhibidores del tráfico en la vía secretora temprana. La sobreexpresión de Sec12 produce una inhibición en la formación de vesículas cubiertas de COPII, impidiendo el transporte anterógrado mediado por estas vesículas. En el mutante ARF1 (Q71L) está inhibida la formación de vesículas COPI, por lo que se impide el transporte de retorno desde Golgi hasta el ER.

Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que en presencia del mutante ARF1 (Q71L), RFP-p24 δ 5 se relocaliza parcialmente desde el ER hasta el complejo de Golgi. Estos resultados sugieren que la localización de la proteína p24 δ 5 (subclase p24 δ -1) es el resultado de su eficiente transporte de retorno desde el Golgi hasta el ER en vesículas COPI. Por este motivo, la localización en estado estacionario de la proteína p24 δ 5 es en el ER, aunque esté ciclando entre ER y Golgi (Langhans et al., 2008). El mismo tipo de experimentos se realizó con p24 δ 9 (subclase p24 δ -2). Se observó que en presencia del mutante ARF1 (Q71L), la localización de la proteína p24 δ 9 sobreexpresada individualmente no se veía afectada, permaneciendo en el ER. Este resultado sugiere que la proteína p24 δ 9 no cicla entre ER y Golgi, al menos cuando se expresa individualmente, posiblemente porque necesita de alguna otra proteína p24 para facilitar su transporte anterógrado; alternativamente, la cinética de su posible transporte ER-Golgi podría ser más lenta.

En el caso de las proteínas p24 β (p24 β 2 y p24 β 3), la sobreexpresión de Sec12 (y la inhibición de la formación de vesículas COPII) produce su relocalización desde el Golgi hasta el ER, sugiriendo que su transporte ER-Golgi es dependiente de vesículas COPII. En estas

circunstancias, la proteína p24 β 3 muestra, además de una localización en el ER, un patrón punteado que coincide con el patrón mostrado por un marcador de ERES (6 kDa-VP). Este es un comportamiento diferencial entre ambas proteínas p24 β que no había sido documentado hasta el momento. Una posible explicación es que p24 β 3 siga una cinética de ciclaje más lenta y las proteínas que han alcanzado el Golgi y que no han sido aún recicladas al ER sean insensibles al tratamiento. Existen otros trabajos donde se muestran que la salida del ER de un receptor adrenérgico y de un receptor de angiotensina II podría estar regulada de manera diferencial por Sar1 (Dong et al., 2008).

3.2. DETERMINANTES ESTRUCTURALES PARA LA LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS p24

En ensayos previos en nuestro grupo de investigación se ha demostrado que el motivo de di-lisina localizado en (-3, -4) es necesario y suficiente para su localización en ER. Mutantes RFP-p24 δ 5-CT^{SS} (carentes del motivo de di-lisina), se localizaron en el PVC o la vacuola. Estos resultados sugieren que el motivo de di-lisina está implicado en el transporte retrógrado de estas proteínas p24 desde el Golgi hasta el ER, como señales de clasificación en vesículas recubiertas por COPI. En ausencia de dicho motivo, las proteínas p24 se transportan por defecto hasta la vacuola, pasando por el PVC.

Además, se observó que la salida de estas proteínas p24 desde ER hacia el Golgi es dependiente de COPII, puesto que mutantes sin el motivo de di-lisina, cuando se co-expresaban con la proteína Sec12 para inhibir la formación de vesículas COPII, permanecían en el ER, y no eran transportadas a la vacuola, sugiriendo de este modo una salida mediada por COPII de estas proteínas p24 (Langhans et al., 2008).

En el presente trabajo investigamos si el motivo de di-lisina presente en la cola citoplasmática es suficiente para su localización en el ER y para el tráfico en la vía secretora temprana, o si los dominios luminales GOLD y “coiled-coil” podrían tener también un papel importante en la localización y tráfico intracelular de las proteínas p24.

Usando como modelo la proteína p24 δ 5 (RFP-p24 δ 5), se ha demostrado que ni el dominio GOLD ni el dominio CC (región luminal) son necesarios para la localización en el ER de la proteína RFP-p24 δ 5 en estado estacionario, ni para el ciclaje de esta proteína en la vía secretora temprana, al menos cuando se expresa individualmente. El hecho de que la versión

mutante de RFP-p24 δ 5 que solo contiene la región transmembrana y la cola citosólica se localice correctamente en el ER, a menos de que el motivo de di-lisina esté mutado, implica que el motivo de di-lisina presente en la cola citosólica es el determinante más importante para la localización de RFP-p24 δ 5 en el ER, presumiblemente facilitando su interacción con la cubierta de COPI. Por el contrario, el dominio luminal (en particular el dominio CC) parece ser necesario para el transporte de los mutantes de di-lisina hacia el lumen de la vacuola.

La contribución relativa de los diferentes dominios de RFP-p24 δ 5 para el tráfico de la proteína p24 δ 5 está en concordancia con los resultados observados para construcciones similares con GFP unida a la proteína p23 (p24 δ 1) en células animales (Blum and Lepier, 2008). En este trabajo se demostró que el mínimo requerimiento para el tráfico de p23 en la vía secretora temprana fue un dominio transmembrana y una cola citosólica con el motivo KKLIE intacto. El dominio luminal fue dispensable para ciclar entre ER-Golgi, pero necesario para el tráfico a través del aparato de Golgi hasta la superficie celular (o ruta lateral alternativa). En otros estudios, sin embargo, se observó que la localización del dímero p23/p24 fue independiente del motivo KKLIE de p23, pero sí que se requería el dominio CC (Emery et al., 2000). Se ha de señalar que, a diferencia de p23 (p24 δ 1), la proteína p24 δ 5 tiene una cola C-terminal con las características de las proteínas p25 (p24 α) de animales, con mayor afinidad para COPI (Contreras et al., 2004), la cual es responsable de un reciclaje eficiente desde el Golgi hasta el ER (Langhans et al., 2008). Por ello, la información contenida en la cola citosólica de la proteína RFP-p24 δ 5, en contraste con p24 δ 1, podría ser suficiente para su localización en el ER en estado estacionario. Este escenario se ha propuesto también para las proteínas p25 de mamíferos, las cuales residen normalmente en el ER, incluso cuando se co-expresan con p23, p24 y p26 (Emery et al., 2000).

4. INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS p24 Y TRÁFICO ACOPLADO DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA p24

Se ha propuesto que el tráfico de ida y vuelta de las proteínas p24 entre el ER y el Golgi (vía secretora temprana) puede depender de las distintas interacciones que se producen entre proteínas p24 con distintos miembros de la familia.

En animales y levaduras se ha demostrado que las proteínas p24 pueden formar complejos heterotetraméricos, a través de sus dominios CC, con un representante de cada subfamilia (Fullekrug et al., 1999; Marzioch et al., 1999). Otros estudios muestran que en levaduras estos tetrámeros podrían tratarse en realidad de un doble dímero (Ciuffo and Boyd, 2000). Estudios posteriores apuntan sin embargo, que la forma en la que podemos encontrar estas proteínas p24 es en su forma monomérica o dimérica, con una composición dependiente de su localización subcelular (Jenne et al., 2002). En la mayoría de los casos, estos dímeros están formados por un representante de la subfamilia p24 δ y un representante de la subfamilia p24 β . Existen ejemplos tanto en animales como en levaduras donde se observa esta composición de dímeros, albergando un miembro de cada subfamilia, y donde el transporte retrógrado (desde el Golgi hasta el ER) parece depender del motivo de di-lisina presente únicamente en las proteínas de la subfamilia p24 δ . En levaduras, las proteínas Erv25 (subfamilia p24 δ) y Emp24 (subfamilia p24 β) forman un complejo que se incorpora eficientemente a vesículas COPII que pueden salir del ER sin la presencia de Erp1 o Erp2, que son componentes putativos del complejo tetramérico de p24 en levaduras (Belden and Barlowe, 1996; Belden and Barlowe, 2001). En animales, complejos formados por p23 (subfamilia p24 δ) y p24 (subfamilia p24 β) pueden salir del ER para ser transportados hacia el aparato de Golgi (Gommel et al., 1999; Emery et al., 2000). En ambos casos, el transporte retrógrado podría depender del motivo de di-lisina presente en los miembros de la subfamilia p24 δ : Erv25 en levaduras (Belden and Barlowe, 2001) y p23 en animales (Gommel et al., 1999).

En base a estos estudios previos, se han utilizado distintas aproximaciones para determinar las posibles interacciones entre distintas proteínas p24 en *Arabidopsis*. En primer lugar, ensayos de co-expresión, que han permitido establecer que la expresión de ciertas proteínas p24 influye sobre la localización y estabilidad de otras, lo que sugiere la existencia de interacciones entre ellas. También se han utilizado aproximaciones bioquímicas (ensayos de co-inmunoprecipitación o “pull-down”) para determinar interacciones directas entre las distintas proteínas p24. Finalmente se han empleado mutantes simples de proteínas p24 de

expresión nula o disminuida, ya que se ha observado que la falta o disminución de la expresión de alguna de estas proteínas podría afectar a la estabilidad de otras proteínas p24.

Las distintas aproximaciones nos indican que las proteínas p24 δ 5 y p24 β 2 de *Arabidopsis* podrían interactuar a través de sus dominios CC. En primer lugar, los niveles de p24 β 2 parecen depender de la presencia de p24 δ 5, ya que el mutante de expresión nula p24 δ 5-1 muestra unos niveles de expresión muy reducidos de p24 β 2. Estos resultados están en la misma línea con lo observado en levaduras y animales, donde la eliminación o reducción de la expresión de un miembro de la familia p24 afecta a los niveles de otros miembros de la familia, sugiriendo una interacción entre estas proteínas (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch et al., 1999; Denzel et al., 2000; Vetrivel et al., 2007; Jerome-Majewska et al., 2010; Kogler et al., 2010; Zhang and Volchuk, 2010). Los experimentos de co-inmunoprecipitación mostraron que las proteínas p24 δ 5 y p24 β 2 endógenas interactúan directamente, ya que la inmunoprecipitación con anticuerpos para p24 δ 5 es capaz de co-inmunoprecipitar p24 β 2, y viceversa. Esta interacción resultó ser dependiente de pH: la interacción está más favorecida a pH neutro (7.5) que a pH ácido (6.0), sugiriendo que la interacción podría estar favorecida al pH neutro del ER.

Los experimentos de expresión transitoria también indican que estas proteínas interactúan. Cuando la proteína GFP-p24 β 2 se expresa sola parece ser inestable (ver sección 2 de la Discusión General), y es muy difícil de observar mediante microscopia confocal o análisis "western". Sin embargo, los niveles de GFP-p24 β 2 aumentan enormemente cuando se co-expresa con la proteína RFP-p24 δ 5, un efecto que no se observa cuando se usa la versión mutante de RFP-p24 δ 5 sin el motivo CC (RFP-p24 δ 5 Δ CC). Esto sugiere que la interacción de p24 δ 5, a través de su dominio CC, estabiliza a la proteína p24 β 2. Por el contrario, los niveles de expresión de RFP-p24 δ 5 son independientes de la presencia de GFP-p24 β 2, probablemente como consecuencia de su localización mayoritaria en el ER. Se ha observado que la co-expresión con GFP-p24 β 2 sí que modifica el patrón de localización de la proteína RFP-p24 δ 5, pasando de tener un patrón muy localizado en el ER, a un patrón de localización más punteado, donde ambas proteínas co-localizan. Además esta co-localización se produce al menos parcialmente en los ERES, ya que ambas proteínas co-localizan con el marcador de ERES 6 kDa-VP. Estas proteínas parecen viajar juntas a lo largo de la vía secretora temprana, ya que al utilizar el mutante ARF1 (Q71L), que tiene inhibido el transporte retrógrado dependiente de vesículas COPI, la proteína GFP-p24 β 2 expresada individualmente en estas condiciones, es transportada hacia la vacuola. Sin embargo, cuando se co-expresa junto con RFP-p24 δ 5, la

proteína GFP-p24 β 2 no se transporta hacia la vacuola y co-localiza con RFP-p24 δ 5 en estructuras punteadas. Esto sugiere que RFP-p24 δ 5 es capaz de mantener a GFP-p24 β 2 en la interfase ER-Golgi y probablemente mediar en el transporte acoplado retrógrado de ambas proteínas hacia el ER. Por ello, es posible que la localización en estado estacionario de estas proteínas endógenas y su estabilidad reflejen un fino balance entre los niveles de las dos proteínas.

Resultados muy similares se obtuvieron cuando se extendió el estudio a la interacción de p24 β 2 con un miembro de la otra subfamilia de p24 δ , la proteína p24 δ 9, sugiriendo un transporte acoplado entre ambas proteínas. Por el contrario, la proteína p24 β 3 solo muestra una co-localización parcial con las dos proteínas p24 δ . Sin embargo, se observó un aumento de la estabilidad de la proteína p24 β 3 cuando se co-expresó con ambas p24 δ simultáneamente (p24 δ 5 y p24 δ 9). Otros experimentos de expresión transitoria co-expresando p24 δ 5, p24 δ 9, p24 β 2 y p24 β 3 mostraron una co-localización parcial entre las cuatro proteínas. Sorprendentemente, en estas condiciones p24 β 3 (y no p24 β 2) se relocalizaba parcialmente en el ER, sugiriendo que las proteínas p24 δ podrían ayudar en el transporte retrógrado de esta proteína p24 β 3 desde el Golgi hasta el ER, contribuyendo al aumento de su estabilidad.

Mediante los ensayos de estabilidad, utilizando mutantes de expresión nula o disminuida para alguna de las proteínas p24 se observó que la ausencia de una proteína p24 tenía una repercusión en los niveles de otras proteínas de la familia p24, como ya se había observado en levaduras y en animales proteínas (Belden and Barlowe, 1996; Marzioch et al., 1999; Denzel et al., 2000; Vetrivel et al., 2007; Jerome-Majewska et al., 2010; Koegler et al., 2010; Zhang and Volchuk, 2010). Estos resultados están en concordancia con los experimentos de co-inmunoprecipitación y “pull-down”, sugiriendo que los miembros de las subfamilias p24 β y p24 δ interaccionan unos con otros.

Modelo propuesto de tráfico acoplado de proteínas p24 en la vía secretora temprana

Los resultados obtenidos sugieren que es necesaria una dinámica elevada y la existencia de interacciones complejas entre miembros p24 de cada subfamilia para una correcta localización y estabilidad de estas proteínas, y de esta manera poder ejercer su función correctamente. Estas interacciones tienen lugar a través del dominio CC y son dependientes de pH.

La estequiometría y composición de estos complejos aún no ha sido determinada, pero los experimentos reflejados en la presente tesis sugieren que (Figura 18):

- Los complejos “anterógrados” deben incluir a p24 β 2, la cual facilita el transporte de p24 δ 5 (subclase p24 δ -1) y p24 δ 9 (subclase p24 δ -2) hacia el complejo de Golgi.
- Los complejos “retrógrados” deben contener proteínas p24 δ , para salir del Golgi en vesículas COPI, probablemente incluyendo miembros de la subclase p24 δ -1 y p24 δ -2. Presumiblemente, p24 β 3 podría ser reciclado hacia el ER a través de estos complejos que contienen miembros de la subclase p24 δ -1 y p24 δ -2.

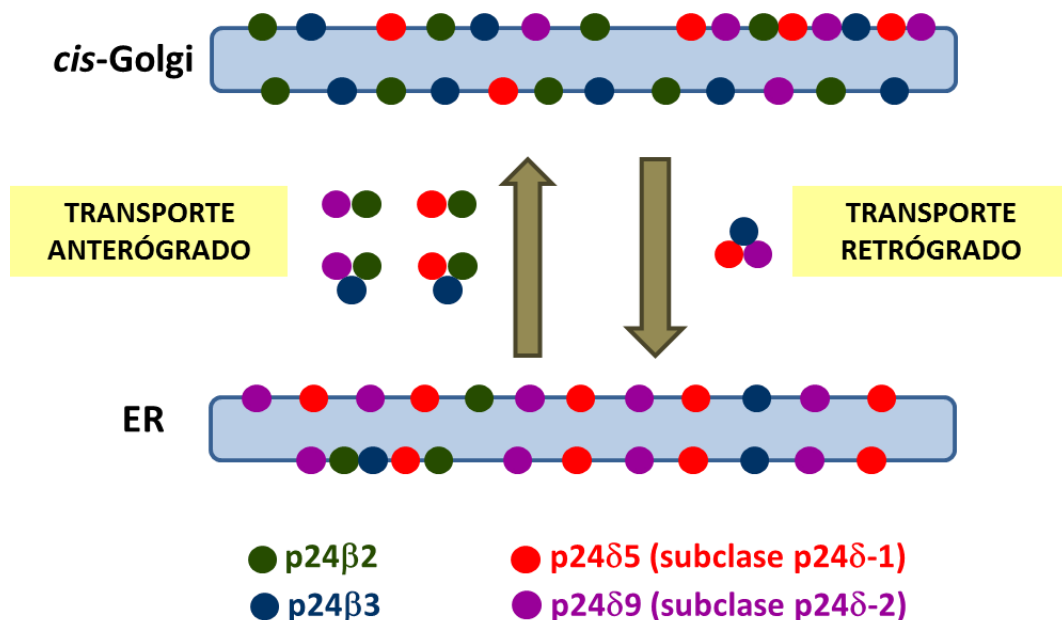


Figura 18. Modelo de tráfico acoplado de las proteínas p24 en la vía secretora temprana. Los complejos “anterógrados” deben incluir la proteína p24 β 2, facilitando el transporte hacia el Golgi de las proteínas p24 δ mediado por vesículas COP II. Los complejos “retrógrados” deben incluir a las proteínas p24 δ , con señal de clasificación en vesículas COP I. La proteína p24 β 3 podría incluirse en estos complejos para volver al ER desde el Golgi.

5. APROXIMACIONES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS p24 EN ARABIDOPSIS

5.1. PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE PROTEÍNAS p24

Durante el desarrollo de la tesis se han caracterizado mutantes nulos de inserción de T-DNA para los genes *p24 δ 4*, *p24 δ 5* (subclase *p24 δ -1*) y *p24 δ 10* (subclase *p24 δ -2*) pertenecientes a la colección SALK de mutantes de T-DNA.

En el caso de las proteínas de la subfamilia *p24 β* , no se han encontrado mutantes de inserción de T-DNA ni para *p24 β 2* ni para *p24 β 3*, lo que sugiere que la ausencia de alguna de las dos proteínas podría resultar letal para el desarrollo de la planta. Debido a ello, se han generado microARNs artificiales (amiRNAs) que se han usado para disminuir la expresión de los genes (hasta un 80% aproximadamente).

Ninguno de los mutantes individuales de las proteínas p24 de la subfamilia δ y β mostraron un fenotipo diferente al de plantas salvajes en condiciones estándar de crecimiento, sugiriendo la existencia de redundancia funcional entre los miembros de las diferentes subfamilias. Por ello, durante el desarrollo de la tesis se ha caracterizado también el doble mutante *p24 δ 4 δ 5*, mediante el cruce entre los mutantes individuales *p24 δ 4-1* y *p24 δ 5-1*. Se han obtenido plantas homocigotas que tampoco presentaron ningún fenotipo diferencial en condiciones de crecimiento estándar. Por ello, en nuestro grupo de investigación se están generando actualmente dobles, triples y múltiples mutantes de miembros de la familia p24 con el objetivo de investigar posibles funciones específicas de las proteínas de esta familia en plantas.

5.2. IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS p24 EN EL TRANSPORTE RETRÓGRADO DEL RECEPTOR K/HDEL (ERD2) AL ER DEPENDIENTE DE VESÍCULAS COPI

Como una aproximación alternativa a los experimentos de pérdida de función, se han desarrollado experimentos de ganancia de función, sobreexpresando proteínas p24 específicas y evaluando su influencia en el tráfico de posibles cargos. Para estos estudios se ha utilizado como modelo la proteína *p24 δ 5*, puesto que su tráfico ha sido ampliamente estudiado y caracterizado dentro de la vía secretora temprana (Langhans et al., 2008). Sin embargo, el

inconveniente de esta estrategia es que no se había identificado hasta el momento ningún posible cargo cuyo transporte estuviera mediado por proteínas p24 en plantas.

En mamíferos, se ha visto que las proteínas p24 forman complejos hetero-oligoméricos que se unen a proteínas GPI correctamente remodeladas para concentrar a estas proteínas con anclas de GPI (GPI-APs) en los ERES, para su empaquetamiento en vesículas COPII y su transporte al complejo de Golgi. Una vez en el Golgi, las proteínas p24 se disocian de las GPI-APs debido al pH ácido presente en este orgánulo. A partir de ahí, las GPI-APs se transportan hacia la superficie celular y las proteínas p24 son recicladas hacia el ER (Fujita et al., 2011). En levaduras, la salida de las GPI-APs parece ser independiente de las proteínas p24. En este caso, las proteínas p24 podrían actuar como adaptadores que facilitan la formación de las vesículas mediante el reclutamiento de componentes específicos de COPII en ERES específicos ya enriquecidos en GPI-APs. En plantas sin embargo, solo se había documentado hasta el momento un posible cargo para las proteínas p24, la proteína GLL23 (“myrosinase-associated protein”) (Jancowski et al., 2014).

Las proteínas p24 de la subfamilia p24 δ parecen jugar un papel fundamental en el transporte retrógrado desde Golgi hasta el ER mediado por vesículas COPI. Por ello, decidimos investigar el transporte de la proteína ERD2, que es un receptor que rescata proteínas que contienen la señal HDEL/KDEL desde el Golgi hasta el ER. Estudios previos en mamíferos habían mostrado que la proteína p23 (proteína p24 δ) interacciona con ERD2 y está implicada en su transporte retrógrado Golgi-ER, probablemente facilitando la salida del Golgi a través de vesículas COPI. En este estudio, se observó que en el transporte retrógrado de la toxina del cólera (que actúa como cargo) mediado por el receptor ERD2, están implicadas las vesículas COPI, la proteína p23 de mamíferos (p24 δ) y ERD2. Además, se demostró la interacción entre p23 y ERD2, sugiriendo que p23 media directamente en el transporte retrógrado de ERD2 (Majoul et al., 1998). Con lo que respecta a las proteínas p24 de *Arabidopsis*, el hecho de que la proteína p24 δ 5 tenga una cola C-terminal con alta afinidad para COPI, hace que esta proteína (y probablemente otros miembros de la subfamilia p24 δ) sean unos candidatos ideales para tener un papel similar en el transporte retrógrado Golgi-ER en plantas.

Como hemos visto en la introducción, los receptores ERD2 de *Arabidopsis* pueden dividirse en dos clases, la clase I donde se encuentran ERD2a y ERD2b, y que son las que mejor caracterizadas están hasta el momento; y la clase II que incluye otras 5 proteínas ERD2, más alejadas filogenéticamente y de las cuales existen pocos datos relevantes en la actualidad. Por

este motivo, el estudio de la funcionalidad e influencia de las proteínas p24 sobre el receptor ERD2 se ha llevado a cabo utilizando las proteínas ERD2a y ERD2b de *Arabidopsis*.

El transporte retrógrado del receptor K/HDEL esta favorecido por ligandos HDEL y por proteínas p24 δ

En células animales se ha observado que el receptor KDEL se localiza principalmente en la región *cis* del aparato de Golgi en estado estacionario. Sin embargo, tras la sobreexpresión de proteínas que contienen la señal KDEL se produce una redistribución del receptor ERD2 hacia el ER (Lewis and Pelham, 1992). Un efecto similar se ha observado usando la toxina del cólera. Esta toxina entra en la célula mediante la ruta endocítica dependiente de caveolas, hasta que alcanza el aparato de Golgi. En el Golgi, la toxina se disocia en dos subunidades, A y B. La subunidad A puede salir del Golgi hacia el ERGIC mediante transporte retrógrado ya que actúa como un ligando KDEL, provocando la redistribución del receptor ERD2 desde el Golgi hacia el ER. Este proceso se puede monitorizar y visualizar utilizando una versión del receptor ERD2 unido a una proteína fluorescente. Se postuló que dicha redistribución de ERD2 podría deberse a una concentración, favorecida por la unión de ligando, de receptores ERD2 en vesículas COPI para su transporte retrógrado desde el Golgi hasta el ER (Aoe et al., 1997; Majoul et al., 1998).

Nuestros estudios indican que la sobreexpresión de ligandos HDEL en plantas también produce una redistribución de los receptores ERD2a y ERD2b de *Arabidopsis* desde el Golgi hasta el ER. En este mismo sentido, se ha observado el mismo efecto de redistribución de los receptores ERD2 cuando se sobreexpresan proteínas p24 δ de las subclases p24 δ -1 (p24 δ 5) y p24 δ -2 (p24 δ 9). Estos resultados concuerdan con observaciones previas, donde la proteína p23 se asocia con el receptor KDEL durante su transporte desde el Golgi hasta el ER (Majoul et al., 1998). Dicho efecto requiere del motivo de di-lisina en el extremo C-terminal de p24 δ 5, necesario para su transporte retrógrado desde el Golgi hasta el ER, y el dominio GOLD, implicado en la interacción de p24 δ 5 con ERD2.

El hecho de que la sobreexpresión de p24 δ 5 evite la secreción de ligandos HDEL, tanto artificiales (GFP-HDEL) como endógenos (BiP), pero no altere la secreción constitutiva en ensayos de secreción, demuestra que una función aumentada de la proteína p24 δ 5 podría favorecer el transporte retrógrado de proteínas ERD2 que lleven unidos ligandos HDEL, cambiando de este modo su localización en estado estacionario. Este efecto podría estar mediado por una interacción directa entre ambas proteínas, que requiere del dominio GOLD

de la proteína p24 δ 5. Sin embargo, la interacción directa entre este dominio GOLD y algún dominio luminal de la proteína ERD2 no ha sido demostrado hasta el momento.

La función de ERD2 y el pH

Se ha demostrado que la unión de ligandos KDEL con el receptor ERD2 *in vitro* es pH-dependiente, mostrando una unión máxima a pH ácido (pH 5.0) y una unión con muy baja eficiencia a pH neutro (pH 7.5) (Wilson et al., 1993; Scheel and Pelham, 1996).

¿Cómo comparan los valores de pH en ER y Golgi con estos extremos? En células animales se estima que el pH del ER es 7.2 y el del *cis*-Golgi en torno a 6.7 (Paroutis et al., 2004). Existen algunas medidas de pH en el ER de plantas, estimándose un pH de 7.5 en células de epidermis de tabaco, 7.7 en raíces de *Arabidopsis* y 7.1 en protoplastos de *Arabidopsis* (Martiniere et al., 2013); tan solo existe una medida para el pH de *cis*-Golgi, 6.8 (Shen et al., 2013). Estas diferencias entre los dos orgánulos no son muy grandes, en torno a 0.5 unidades. Sin embargo, aunque esta pequeña diferencia de pH entre distintos compartimentos en la vía secretora temprana pueda tener un efecto pequeño en los residuos de aminoácidos localizados en los sitios de unión a ligando, la diferencia de afinidad receptor-ligando podría verse amplificada por cambios conformacionales en la proteína provocados por esta ligera diferencia de pH (Dancourt and Barlowe, 2010). En el caso de ERD2, Wilson y col. sugieren que, si bien la unión de ligando puede ocurrir a un pH subóptimo en el complejo de Golgi, en términos de respuesta a pH lo importante no es la afinidad absoluta por el ligando, sino la diferencia de afinidad entre el Golgi y el ER.

Esta dependencia del pH para la interacción también se ha observado en la unión de las proteínas ERD2 y p24 δ 5 con miembros de las cubiertas COPI y COPII. Como ya hemos discutido previamente, el transporte retrógrado de ERD2 es dependiente del motivo de di-lisina presente en la cola citosólica de p24 δ 5 que previamente se había demostrado requiere del motivo de di-lisina en su extremo C-terminal. En este trabajo se ha observado que la unión de p24 δ 5 con ARF1 y con subunidades del coatómero (COPI), ocurre principalmente a pH ácido. Esto era consistente con observaciones previas, donde la unión de ARF1 y subunidades COPI con las membranas del endosoma necesitan de un pH ácido en el lumen del endosoma temprano (Aniento et al., 1996; Gu et al., 1997; Gu and Gruenberg, 2000). Por otro lado, la proteína p24 δ 5 interacciona con el complejo COPII a través de su motivo de di-fenilalanina (Contreras et al., 2004; Contreras et al., 2004). En este trabajo se muestra, que al contrario de lo que sucedía con COPI, la unión de p24 δ 5 con Sec23 (subunidad de COPII) ocurre más

eficientemente a pH neutro que a pH ácido. El receptor ERD2 muestra un patrón de interacción con las subunidades de los complejos COPI y COPII muy similar al que presenta la proteína p24 δ 5, sugiriendo que el reclutamiento de proteínas COPII tanto para ERD2 como para p24 δ 5 requiere condiciones de pH neutro, mientras que el reclutamiento de proteínas COPI está favorecido a pH ácido.

Posible modelo de tráfico acoplado entre proteínas p24 δ y ERD2

Durante el desarrollo de este apartado se ha demostrado que las proteínas p24 δ interactúan con el receptor ERD2, de manera más eficiente a pH ácido que a pH neutro, consistente con la posibilidad de que dicha interacción ocurra en el complejo de Golgi. Esta interacción requiere del dominio GOLD en p24 δ 5. El hecho que p24 δ 5 y ERD2 unan de manera muy similar a COPI a pH ácido tanto si se expresan de manera simultánea o individualmente, sugiere que la interacción entre ERD2 y p24 δ 5 carece de influencia sobre la unión de COPI a las proteínas individuales. Sin embargo, la interacción entre ERD2 y p24 δ que se produce a pH ácido (Golgi), donde los ligandos K/HDEL se unen de manera eficiente a su receptor K/HDEL, podría estar incrementando los sitios de unión de COPI en la membrana de *cis*-Golgi. La interacción con p24 δ , y la presumible oligomerización de ERD2, podría incrementar la posibilidad de que se incluya a ERD2 en vesículas COPI en el *cis*-Golgi para su transporte retrógrado desde el Golgi hasta el ER.

Una vez en el ER, el receptor ERD2 libera su ligando al pH neutro presente en el ER, se disocia de las proteínas p24 δ , y posteriormente se incluye en vesículas COPII (Aoe et al., 1997; Aoe et al., 1998; Majoul et al., 2001; Capitani and Sallèse, 2009) mediante mecanismos aún por determinar, para su transporte anterógrado desde el ER hasta el Golgi, dónde puede ejercer de nuevo su función como receptor de ligandos K/HDEL (Figura 19).

El análisis e integración de todos los resultados obtenidos durante el desarrollo de la tesis en este apartado nos permite sugerir un modelo de transporte de ERD2 y p24 δ 5/ δ 9. En estado estacionario, la localización del receptor K/HDEL (ERD2) es el resultado del transporte anterógrado desde el ER hasta el complejo de Golgi de moléculas de receptor libres (en vesículas COPII) y del transporte retrógrado desde el Golgi hacia el ER de moléculas del receptor que llevan unidas sus ligandos K/HDEL (unión que se produce al pH ácido del Golgi) mediante vesículas COPI. La unión de los ligandos a los receptores ERD2 induce presumiblemente una oligomerización de ERD2 (Xu and Liu, 2012), la cual incrementa la probabilidad de ERD2 de ser incluida en vesículas de salida COPI. Esto podría explicar por qué

la sobreexpresión de ligandos HDEL cambia la distribución de ERD2 en estado estacionario desde el Golgi hasta el ER, mediante el incremento de su transporte retrógrado. Además, como hemos visto anteriormente, la unión entre ARF1 y subunidades de COPI está más favorecida al pH más ácido del aparato de Golgi. Por otro lado, también se ha propuesto que las proteínas p24 son esenciales para la biogénesis de las vesículas COPI (Aguilera-Romero et al., 2008); de hecho, la proteína p24 δ 5 es capaz de interactuar con ARF1 y subunidades de COPI al pH ácido del aparato de Golgi. Mediante su unión a ERD2 en el aparato de Golgi, las proteínas p24 δ podrían por tanto facilitar la salida de ERD2 dentro de vesículas COPI, lo que a su vez facilitaría el transporte retrógrado de los ligandos K/HDEL unidos a ERD2. Esto podría explicar porque p24 δ 5 y p24 δ 9 también cambian la distribución de ERD2 en estado estacionario desde Golgi hacia el ER.

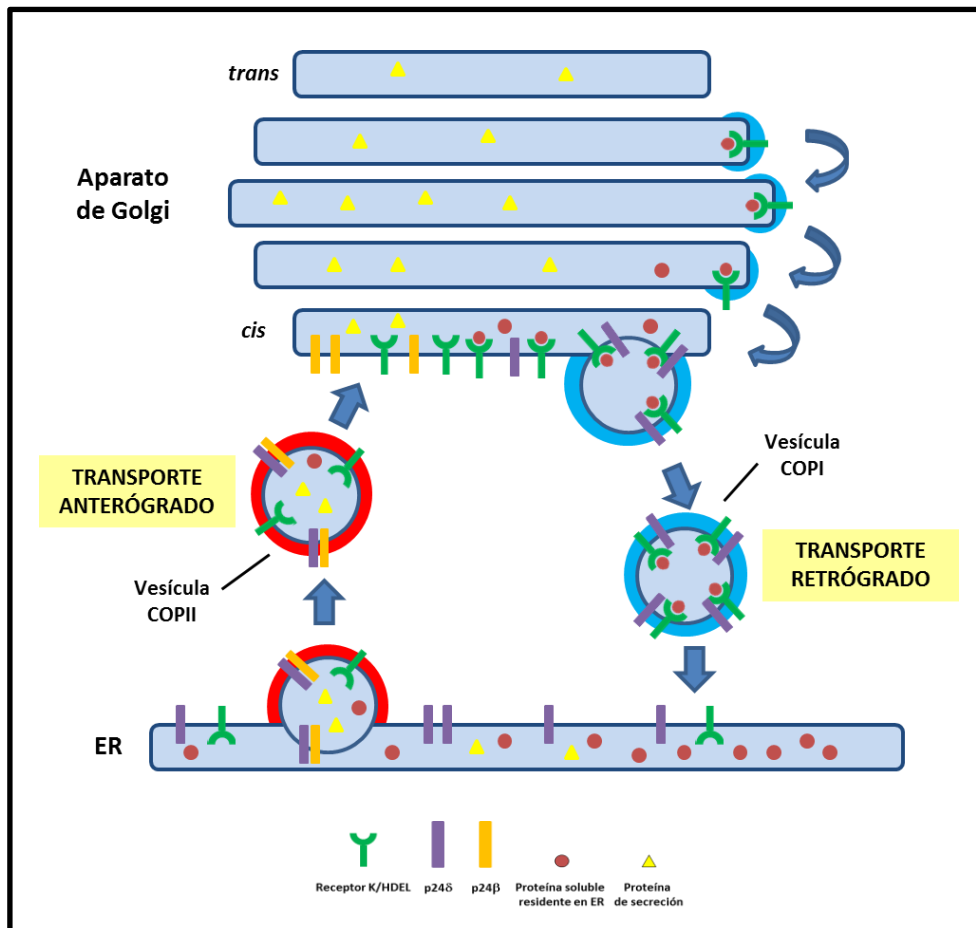


Figura 19. Modelo de tráfico acoplado entre proteínas p24 δ y ERD2. Los ligandos K/HDEL se unen a los receptores ERD2 al pH ácido del Golgi, provocando posiblemente una oligomerización de los receptores ERD2, que van a ser incluidos en vesículas COPI para su transporte al ER. La unión de proteínas p24 δ a estos receptores ERD2 podría facilitar la inclusión de éstos en las vesículas COPI. Una vez en el ER, los receptores ERD2 liberan sus ligandos y se disocian de las proteínas p24 δ , quedando como moléculas libres, disponibles para incluirse en vesículas COPII para su transporte de nuevo hacia el Golgi, donde volverán a realizar su función. Las proteínas p24 β facilitan el transporte anterógrado de las proteínas p24 δ .

CONCLUSIONES

1. Las proteínas de la subfamilia p24 δ de *Arabidopsis thaliana*, p24 δ 5 y p24 δ 9, se localizan mayoritariamente en el ER en estado estacionario, pero ciclan entre el ER y el Golgi por medio de vesículas COPI y COPII. El motivo de di-lisina, presente en su cola citosólica C-terminal, es necesario y suficiente para su localización y tráfico en la vía secretora temprana, siendo fundamental para su transporte retrógrado desde el complejo de Golgi hasta el ER mediado por vesículas COPI. Los dominios luminales no son esenciales para su transporte en la vía secretora temprana, pero podrían participar en su transporte post-Golgi hacia la vacuola.
2. La ausencia de una única proteína de la subfamilia p24 δ no produce alteraciones fenotípicas en plantas crecidas en condiciones de crecimiento estándar, sugiriendo una posible redundancia funcional entre los miembros de esta subfamilia.
3. Las proteínas de la subfamilia p24 β , p24 β 2 y p24 β 3, se localizan en estado estacionario mayoritariamente en el *cis*-Golgi aunque también ciclan entre el ER y Golgi. La salida de ambas proteínas desde el ER hacia el aparato de Golgi se produce a través de vesículas recubiertas por COPII. Cuando se sobreexpresan de forma individual, ambas proteínas se degradan por cisteín proteasas, probablemente como consecuencia de su transporte desde el Golgi hasta compartimentos ácidos, tales como el compartimento prevacuolar y la vacuola.
4. Las proteínas p24 pueden formar complejos hetero-oligoméricos compuestos por proteínas de las subfamilias p24 β y p24 δ , que probablemente interactúan a través del dominio "coiled-coil", determinando su correcta localización y estabilidad. La estequiometría y composición de estos complejos no se ha determinado aunque los resultados obtenidos sugieren la existencia de complejos anterógrados (ER-Golgi) que deben contener a la proteína p24 β 2, que facilita la salida desde el ER de las proteínas p24 δ 5 (subclase p24 δ -1) y p24 δ 9 (subclase p24 δ -2) hacia el aparato de Golgi. Por otro lado, los complejos retrógrados (Golgi-ER) deben contener proteínas p24 δ para su inclusión en vesículas recubiertas de COPI y podrían mediar en el retorno de la proteína p24 β 3 desde el Golgi al ER.
5. Existe una interacción directa entre las proteínas p24 δ 5/ δ 9 y el receptor K/HDEL ERD2a que requiere del dominio GOLD de las proteínas p24 δ 5/ δ 9. Además, esta interacción es dependiente de pH, siendo óptima al pH del complejo de Golgi, más ácido, y muy baja a pH neutro. La proteína p24 δ 5 y el receptor ERD2a también interactúan con los

componentes de la cubierta de COPI y COPII de manera dependiente de pH. La interacción con componentes de la cubierta COPII está favorecida a pH neutro, mientras que la interacción con los componentes de la cubierta COPI está favorecida al pH más ácido del complejo de Golgi.

6. Las proteínas p24 δ 5/p24 δ 9 cambian la distribución en estado estacionario de los receptores K/HDEL (ERD2a y ERD2b), desde el *cis*-Golgi hacia el ER, sugiriendo que p24 δ 5 y p24 δ 9 facilitan el transporte retrógrado de ERD2a y ERD2b. La sobreexpresión de ligandos HDEL también produce una redistribución parcial de ERD2a y ERD2b desde el Golgi hasta el ER, probablemente por inducir su oligomerización. Además, el aumento de la función de p24 δ 5 favorece la recuperación de ligandos con señales HDEL. Un efecto similar se produce al aumentar la función de ERD2a, siendo el efecto aditivo con el de p24 δ 5. Todo esto sugiere que las proteínas p24 δ podrían facilitar la salida desde el *cis*-Golgi de los receptores ERD2 dentro de vesículas COPI, lo que a su vez facilitaría el transporte retrógrado de los ligandos K/HDEL unidos a estos receptores.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, P.S., Frohlich, F., Rehman, M., Shales, M., Ulitsky, I., Olivera-Couto, A., Braberg, H., Shamir, R., Walter, P., Mann, M., Ejsing, C.S., Krogan, N.J., and Walther, T.C. (2010). A plasma-membrane E-MAP reveals links of the eisosome with sphingolipid metabolism and endosomal trafficking. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 901-908.

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

Ahmed, S.U., Rojo, E., Kovaleva, V., Venkataraman, S., Dombrowski, J.E., Matsuoka, K., and Raikhel, N.V. (2000). The plant vacuolar sorting receptor AtELP is involved in transport of NH₂-terminal propeptide-containing vacuolar proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Biol.* *149*, 1335-1344.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell* (New York, N.Y. ; Abingdon: Garland Science).

Anantharaman, V., and Aravind, L. (2002). The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol.* *3*, research0023.

Aniento, F., Gu, F., Parton, R.G., and Gruenberg, J. (1996). An endosomal beta COP is involved in the pH-dependent formation of transport vesicles destined for late endosomes. *J. Cell Biol.* *133*, 29-41.

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

Aoe, T., Lee, A.J., van Donselaar, E., Peters, P.J., and Hsu, V.W. (1998). Modulation of intracellular transport by transported proteins: insight from regulation of COPI-mediated transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 1624-1629.

Appenzeller-Herzog, C., and Hauri, H.P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J. Cell. Sci.* *119*, 2173-2183.

Barlowe, C.K., and Miller, E.A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* *193*, 383-410.

Barr, F.A., Preisinger, C., Kopajtich, R., and Korner, R. (2001). Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* *155*, 885-891.

Belden, W.J., and Barlowe, C. (2001). Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J. Biol. Chem.* *276*, 43040-43048.

Belden, W.J., and Barlowe, C. (1996). Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J. Biol. Chem.* *271*, 26939-26946.

- Benghezal, M., Wasteneys, G.O., and Jones, D.A.** (2000). The C-terminal dilysine motif confers endoplasmic reticulum localization to type I membrane proteins in plants. *Plant Cell* *12*, 1179-1201.
- Blum, R., Feick, P., Puype, M., Vandekerckhove, J., Klengel, R., Nastainczyk, W., and Schulz, I.** (1996). Tmp21 and p24A, two type I proteins enriched in pancreatic microsomal membranes, are members of a protein family involved in vesicular trafficking. *J. Biol. Chem.* *271*, 17183-17189.
- Blum, R., and Lepier, A.** (2008). The luminal domain of p23 (Tmp21) plays a critical role in p23 cell surface trafficking. *Traffic* *9*, 1530-1550.
- Blum, R., Pfeiffer, F., Feick, P., Nastainczyk, W., Kohler, B., Schafer, K.H., and Schulz, I.** (1999). Intracellular localization and in vivo trafficking of p24A and p23. *J. Cell. Sci.* *112 (Pt 4)*, 537-548.
- Boevink, P., Oparka, K., Santa Cruz, S., Martin, B., Betteridge, A., and Hawes, C.** (1998). Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* *15*, 441-447.
- Boulaflous, A., Saint-Jore-Dupas, C., Herranz-Gordo, M.C., Pagny-Salehabadi, S., Plasson, C., Garidou, F., Kiefer-Meyer, M.C., Ritzenthaler, C., Faye, L., and Gomord, V.** (2009). Cytosolic N-terminal arginine-based signals together with a luminal signal target a type II membrane protein to the plant ER. *BMC Plant. Biol.* *9*, 144-2229-9-144.
- Brandizzi, F., and Barlowe, C.** (2013). Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 382-392.
- Brandizzi, F., Frangne, N., Marc-Martin, S., Hawes, C., Neuhaus, J.M., and Paris, N.** (2002). The destination for single-pass membrane proteins is influenced markedly by the length of the hydrophobic domain. *Plant Cell* *14*, 1077-1092.
- Brandizzi, F., Fricker, M., and Hawes, C.** (2002). A greener world: the revolution in plant bioimaging. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 520-530.
- Brockner, C., Engelbrecht-Vandre, S., and Ungermann, C.** (2010). Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr. Biol.* *20*, R943-52.
- Budnik, A., and Stephens, D.J.** (2009). ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS Lett.* *583*, 3796-3803.
- Cabrera, M., Muniz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martin, M.E., and Velasco, A.** (2003). The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4114-4125.
- Capitani, M., and Sallese, M.** (2009). The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett.* *583*, 3863-3871.
- Carney, G.E., and Bowen, N.J.** (2004). p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biol. Cell.* *96*, 271-278.

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

Chen, F., Hasegawa, H., Schmitt-Ulms, G., Kawarai, T., Bohm, C., Katayama, T., Gu, Y., Sanjo, N., Glista, M., Rogaeva, E., Wakutani, Y., Pardossi-Piquard, R., Ruan, X., Tandon, A., Checler, F., Marambaud, P., Hansen, K., Westaway, D., St George-Hyslop, P., and Fraser, P. (2006). TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity. *Nature* 440, 1208-1212.

Chen, J., Qi, X., and Zheng, H. (2012). Subclass-specific localization and trafficking of Arabidopsis p24 proteins in the ER-Golgi interface. *Traffic* 13, 400-415.

Ciufo, L.F., and Boyd, A. (2000). Identification of a luminal sequence specifying the assembly of Emp24p into p24 complexes in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 8382-8388.

Contreras, I., Ortiz-Zapater, E., and Aniento, F. (2004a). Sorting signals in the cytosolic tail of membrane proteins involved in the interaction with plant ARF1 and coatomer. *Plant J.* 38, 685-698.

Contreras, I., Yang, Y., Robinson, D.G., and Aniento, F. (2004b). Sorting signals in the cytosolic tail of plant p24 proteins involved in the interaction with the COPII coat. *Plant Cell Physiol.* 45, 1779-1786.

Cooper, G.M., and Hausman, R.E. (2009). *The cell: a molecular approach* (Washington, D.C.; Sunderland, Mass.: ASM Press; Sinauer Associates).

Cosson, P., and Letourneur, F. (1994). Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263, 1629-1631.

Craddock, C.P., Hunter, P.R., Szakacs, E., Hinz, G., Robinson, D.G., and Frigerio, L. (2008). Lack of a vacuolar sorting receptor leads to non-specific missorting of soluble vacuolar proteins in Arabidopsis seeds. *Traffic* 9, 408-416.

Cutrona, M.B., Beznoussenko, G.V., Fusella, A., Martella, O., Moral, P., and Mironov, A.A. (2013). Silencing of mammalian Sar1 isoforms reveals COPII-independent protein sorting and transport. *Traffic* 14, 691-708.

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

daSilva, L.L., Snapp, E.L., Denecke, J., Lippincott-Schwartz, J., Hawes, C., and Brandizzi, F. (2004). Endoplasmic reticulum export sites and Golgi bodies behave as single mobile secretory units in plant cells. *Plant Cell* 16, 1753-1771.

Denecke, J., De Rycke, R., and Botterman, J. (1992). Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J.* 11, 2345-2355.

Denzel, A., Otto, F., Girod, A., Pepperkok, R., Watson, R., Rosewell, I., Bergeron, J.J., Solari, R.C., and Owen, M.J. (2000). The p24 family member p23 is required for early embryonic development. *Curr. Biol.* *10*, 55-58.

Ding, Y., Wang, J., Wang, J., Stierhof, Y.D., Robinson, D.G., and Jiang, L. (2012). Unconventional protein secretion. *Trends Plant Sci.* *17*, 606-615.

Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J.P., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., and Nilsson, T. (1998). gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J. Cell Biol.* *140*, 751-765.

Dong, C., Zhou, F., Fugetta, E.K., Filipeanu, C.M., and Wu, G. (2008). Endoplasmic reticulum export of adrenergic and angiotensin II receptors is differentially regulated by Sar1 GTPase. *Cell. Signal.* *20*, 1035-1043.

Donohoe, B.S., Kang, B.H., Gerl, M.J., Gergely, Z.R., McMichael, C.M., Bednarek, S.Y., and Staehelin, L.A. (2013). Cis-Golgi cisternal assembly and biosynthetic activation occur sequentially in plants and algae. *Traffic* *14*, 551-567.

Drakakaki, G., and Dandekar, A. (2013). Protein secretion: how many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci.* *203-204*, 74-78.

El-Kasmi, F., Pacher, T., Strompen, G., Stierhof, Y.D., Muller, L.M., Koncz, C., Mayer, U., and Jurgens, G. (2011). Arabidopsis SNARE protein SEC22 is essential for gametophyte development and maintenance of Golgi-stack integrity. *Plant J.* *66*, 268-279.

Emery, G., Parton, R.G., Rojo, M., and Gruenberg, J. (2003). The trans-membrane protein p25 forms highly specialized domains that regulate membrane composition and dynamics. *J. Cell. Sci.* *116*, 4821-4832.

Emery, G., Rojo, M., and Gruenberg, J. (2000). Coupled transport of p24 family members. *J. Cell. Sci.* *113 (Pt 13)*, 2507-2516.

Fatal, N., Karhinen, L., Jokitalo, E., and Makarow, M. (2004). Active and specific recruitment of a soluble cargo protein for endoplasmic reticulum exit in the absence of functional COPII component Sec24p. *J. Cell. Sci.* *117*, 1665-1673.

Fuji, K., Shimada, T., Takahashi, H., Tamura, K., Koumoto, Y., Utsumi, S., Nishizawa, K., Maruyama, N., and Hara-Nishimura, I. (2007). Arabidopsis vacuolar sorting mutants (green fluorescent seed) can be identified efficiently by secretion of vacuole-targeted green fluorescent protein in their seeds. *Plant Cell* *19*, 597-609.

Fujita, M., Watanabe, R., Jaensch, N., Romanova-Michaelides, M., Satoh, T., Kato, M., Riezman, H., Yamaguchi, Y., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2011). Sorting of GPI-anchored proteins into ER exit sites by p24 proteins is dependent on remodeled GPI. *J. Cell Biol.* *194*, 61-75.

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

Gao, C., Cai, Y., Wang, Y., Kang, B.H., Aniento, F., Robinson, D.G., and Jiang, L. (2014). Retention mechanisms for ER and Golgi membrane proteins. *Trends Plant Sci.* *19*, 508-515.

Gao, C., Yu, C.K., Qu, S., San, M.W., Li, K.Y., Lo, S.W., and Jiang, L. (2012). The Golgi-localized Arabidopsis endomembrane protein12 contains both endoplasmic reticulum export and Golgi retention signals at its C terminus. *Plant Cell* *24*, 2086-2104.

Gidda, S.K., Shockey, J.M., Rothstein, S.J., Dyer, J.M., and Mullen, R.T. (2009). Arabidopsis thaliana GPAT8 and GPAT9 are localized to the ER and possess distinct ER retrieval signals: functional divergence of the dilysine ER retrieval motif in plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* *47*, 867-879.

Giraud, C.G., and Maccioni, H.J. (2003). Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Mol. Biol. Cell* *14*, 3753-3766.

Gommel, D., Orci, L., Emig, E.M., Hannah, M.J., Ravazzola, M., Nickel, W., Helms, J.B., Wieland, F.T., and Sohn, K. (1999). p24 and p23, the major transmembrane proteins of COPI-coated transport vesicles, form hetero-oligomeric complexes and cycle between the organelles of the early secretory pathway. *FEBS Lett.* *447*, 179-185.

Gu, F., Aniento, F., Parton, R.G., and Gruenberg, J. (1997). Functional dissection of COP-I subunits in the biogenesis of multivesicular endosomes. *J. Cell Biol.* *139*, 1183-1195.

Gu, F., and Gruenberg, J. (2000). ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* *275*, 8154-8160.

Gupta, V., and Swarup, G. (2006). Evidence for a role of transmembrane protein p25 in localization of protein tyrosine phosphatase TC48 to the ER. *J. Cell. Sci.* *119*, 1703-1714.

Hadlington, J.L., and Denecke, J. (2000). Sorting of soluble proteins in the secretory pathway of plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *3*, 461-468.

Hamada, H., Suzuki, M., Yuasa, S., Mimura, N., Shinozuka, N., Takada, Y., Suzuki, M., Nishino, T., Nakaya, H., Koseki, H., and Aoe, T. (2004). Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 8007-8017.

Hanton, S.L., Bortolotti, L.E., Renna, L., Stefano, G., and Brandizzi, F. (2005). Crossing the divide--transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in plants. *Traffic* *6*, 267-277.

Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F.T., and Rothman, J.E. (1994). En bloc incorporation of coatomer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J. Cell Biol.* *124*, 883-892.

Hasegawa, H., Liu, L., and Nishimura, M. (2010). Dilysine retrieval signal-containing p24 proteins collaborate in inhibiting gamma-cleavage of amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* *115*, 771-781.

Hawes, C., Osterrieder, A., Hummel, E., and Sparkes, I. (2008). The plant ER-Golgi interface. *Traffic* *9*, 1571-1580.

- He, P., Peng, Z., Luo, Y., Wang, L., Yu, P., Deng, W., An, Y., Shi, T., and Ma, D.** (2009). High-throughput functional screening for autophagy-related genes and identification of TM9SF1 as an autophagosome-inducing gene. *Autophagy* 5, 52-60.
- Hughes, H., Budnik, A., Schmidt, K., Palmer, K.J., Mantell, J., Noakes, C., Johnson, A., Carter, D.A., Verkade, P., Watson, P., and Stephens, D.J.** (2009). Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional ER. *J. Cell. Sci.* 122, 2924-2934.
- Hwang, I., and Robinson, D.G.** (2009). Transport vesicle formation in plant cells. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 660-669.
- Ito, Y., Uemura, T., and Nakano, A.** (2014). Formation and maintenance of the Golgi apparatus in plant cells. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.* 310, 221-287.
- Jancowski, S., Catching, A., Pighin, J., Kudo, T., Foissner, I., and Wasteneys, G.O.** (2014). Trafficking of the myosinase-associated protein GLL23 requires NUC/MVP1/GOLD36/ERMO3 and the p24 protein CYB. *Plant J.* 77, 497-510.
- Jenne, N., Frey, K., Brugger, B., and Wieland, F.T.** (2002). Oligomeric state and stoichiometry of p24 proteins in the early secretory pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 46504-46511.
- Jerome-Majewska, L.A., Achkar, T., Luo, L., Lupu, F., and Lacy, E.** (2010). The trafficking protein Tmed2/p24beta(1) is required for morphogenesis of the mouse embryo and placenta. *Dev. Biol.* 341, 154-166.
- Kang, B.H., and Staehelin, L.A.** (2008). ER-to-Golgi transport by COPII vesicles in Arabidopsis involves a ribosome-excluding scaffold that is transferred with the vesicles to the Golgi matrix. *Protoplasma* 234, 51-64.
- Kappeler, F., Klopfenstein, D.R., Foguet, M., Paccaud, J.P., and Hauri, H.P.** (1997). The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII. *J. Biol. Chem.* 272, 31801-31808.
- Kim, S.J., and Brandizzi, F.** (2012). News and Views into the SNARE Complexity in Arabidopsis. *Front. Plant. Sci.* 3, 28.
- Klann, M., Koepl, H., and Reuss, M.** (2012). Spatial modeling of vesicle transport and the cytoskeleton: the challenge of hitting the right road. *PLoS One* 7, e29645.
- Koehler, E., Bonnon, C., Waldmeier, L., Mitrovic, S., Halbeisen, R., and Hauri, H.P.** (2010). p28, a novel ERGIC/cis Golgi protein, required for Golgi ribbon formation. *Traffic* 11, 70-89.
- Langhans, M., Marcote, M.J., Pimpl, P., Virgili-Lopez, G., Robinson, D.G., and Aniento, F.** (2008). In vivo trafficking and localization of p24 proteins in plant cells. *Traffic* 9, 770-785.
- Langhans, M., Meckel, T., Kress, A., Lerich, A., and Robinson, D.G.** (2012). ERES (ER exit sites) and the "secretory unit concept". *J. Microsc.* 247, 48-59.
- Lavoie, C., Paiement, J., Dominguez, M., Roy, L., Dahan, S., Gushue, J.N., and Bergeron, J.J.** (1999). Roles for alpha(2)p24 and COPI in endoplasmic reticulum cargo exit site formation. *J. Cell Biol.* 146, 285-299.

- Lee, H.I., Gal, S., Newman, T.C., and Raikhel, N.V.** (1993). The Arabidopsis endoplasmic reticulum retention receptor functions in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 11433-11437.
- Lerich, A., Hillmer, S., Langhans, M., Scheuring, D., van Bentum, P., and Robinson, D.G.** (2012). ER Import Sites and Their Relationship to ER Exit Sites: A New Model for Bidirectional ER-Golgi Transport in Higher Plants. *Front. Plant. Sci.* *3*, 143.
- Lewis, M.J., and Pelham, H.R.** (1992). Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* *68*, 353-364.
- Lewis, M.J., Sweet, D.J., and Pelham, H.R.** (1990). The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system. *Cell* *61*, 1359-1363.
- Li, J., Zhao-Hui, C., Batoux, M., Nekrasov, V., Roux, M., Chinchilla, D., Zipfel, C., and Jones, J.D.** (2009). Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15973-15978.
- Liu, S., Bromley-Brits, K., Xia, K., Mittelholtz, J., Wang, R., and Song, W.** (2008). TMP21 degradation is mediated by the ubiquitin-proteasome pathway. *Eur. J. Neurosci.* *28*, 1980-1988.
- Lozupone, F., Perdicchio, M., Brambilla, D., Borghi, M., Meschini, S., Barca, S., Marino, M.L., Logozzi, M., Federici, C., Iessi, E., de Milito, A., and Fais, S.** (2009). The human homologue of Dictyostelium discoideum phg1A is expressed by human metastatic melanoma cells. *EMBO Rep.* *10*, 1348-1354.
- Luo, W., Wang, Y., and Reiser, G.** (2011). Proteinase-activated receptors, nucleotide P2Y receptors, and mu-opioid receptor-1B are under the control of the type I transmembrane proteins p23 and p24A in post-Golgi trafficking. *J. Neurochem.* *117*, 71-81.
- Luo, W., Wang, Y., and Reiser, G.** (2007). p24A, a type I transmembrane protein, controls ARF1-dependent resensitization of protease-activated receptor-2 by influence on receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* *282*, 30246-30255.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y.** (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* *291*, 316-319.
- Majoul, I., Sohn, K., Wieland, F.T., Pepperkok, R., Pizza, M., Hillemann, J., and Soling, H.D.** (1998). KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J. Cell Biol.* *143*, 601-612.
- Majoul, I., Straub, M., Hell, S.W., Duden, R., and Soling, H.D.** (2001). KDEL-cargo regulates interactions between proteins involved in COPI vesicle traffic: measurements in living cells using FRET. *Dev. Cell.* *1*, 139-153.
- Malkus, P., Jiang, F., and Schekman, R.** (2002). Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J. Cell Biol.* *159*, 915-921.
- Marsh, M., and McMahon, H.T.** (1999). The structural era of endocytosis. *Science* *285*, 215-220.

Marti, L., Fornaciari, S., Renna, L., Stefano, G., and Brandizzi, F. (2010). COPII-mediated traffic in plants. *Trends Plant Sci.* *15*, 522-528.

Martiniere, A., Bassil, E., Jublanc, E., Alcon, C., Reguera, M., Sentenac, H., Blumwald, E., and Paris, N. (2013). In vivo intracellular pH measurements in tobacco and Arabidopsis reveal an unexpected pH gradient in the endomembrane system. *Plant Cell* *25*, 4028-4043.

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

McCartney, A.W., Dyer, J.M., Dhanoa, P.K., Kim, P.K., Andrews, D.W., McNew, J.A., and Mullen, R.T. (2004). Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *Plant J.* *37*, 156-173.

Melville, D.B., and Knapik, E.W. (2011). Traffic jams in fish bones: ER-to-Golgi protein transport during zebrafish development. *Cell. Adh Migr.* *5*, 114-118.

Mitrovic, S., Ben-Tekaya, H., Koegler, E., Gruenberg, J., and Hauri, H.P. (2008). The cargo receptors Surf4, endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment (ERGIC)-53, and p25 are required to maintain the architecture of ERGIC and Golgi. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1976-1990.

Montesinos, J.C., Langhans, M., Sturm, S., Hillmer, S., Aniento, F., Robinson, D.G., and Marcote, M.J. (2013). Putative p24 complexes in Arabidopsis contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway. *J. Exp. Bot.* *64*, 3147-3167.

Montesinos, J.C., Sturm, S., Langhans, M., Hillmer, S., Marcote, M.J., Robinson, D.G., and Aniento, F. (2012). Coupled transport of Arabidopsis p24 proteins at the ER-Golgi interface. *J. Exp. Bot.* *63*, 4243-4261.

Montesinos, J.C., Pastor-Cantizano, N., Robinson, D.G., Marcote, M.J., and Aniento, F. (2014). Arabidopsis p24 δ 5 and p24 δ 9 facilitate COPI-dependent Golgi-to-ER transport of the K/HDEL receptor ERD2. *The Plant Journal*. doi: 10.1111/tpj.12700

Mossessova, E., Bickford, L.C., and Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* *114*, 483-495.

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

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

Napier, R.M., Fowke, L.C., Hawes, C., Lewis, M., and Pelham, H.R. (1992). Immunological evidence that plants use both HDEL and KDEL for targeting proteins to the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Sci.* *102 (Pt 2)*, 261-271.

Nebenfuhr, A., Gallagher, L.A., Dunahay, T.G., Frohlick, J.A., Mazurkiewicz, A.M., Meehl, J.B., and Staehelin, L.A. (1999). Stop-and-go movements of plant Golgi stacks are mediated by the acto-myosin system. *Plant Physiol.* *121*, 1127-1142.

Neumann, U., Brandizzi, F., and Hawes, C. (2003). Protein transport in plant cells: in and out of the Golgi. *Ann. Bot.* *92*, 167-180.

Nickel, W., Sohn, K., Bunning, C., and Wieland, F.T. (1997). p23, a major COPI-vesicle membrane protein, constitutively cycles through the early secretory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 11393-11398.

Niemes, S., Labs, M., Scheuring, D., Krueger, F., Langhans, M., Jesenofsky, B., Robinson, D.G., and Pimpl, P. (2010). Sorting of plant vacuolar proteins is initiated in the ER. *Plant J.* *62*, 601-614.

Nishimura, N., and Balch, W.E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* *277*, 556-558.

Otte, S., and Barlowe, C. (2002). The Erv41p-Erv46p complex: multiple export signals are required in trans for COPII-dependent transport from the ER. *EMBO J.* *21*, 6095-6104.

Park, M., and Jurgens, G. (2012). Membrane traffic and fusion at post-Golgi compartments. *Front. Plant. Sci.* *2*, 111.

Paroutis, P., Touret, N., and Grinstein, S. (2004). The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda)* *19*, 207-215.

Paul, M.J., and Frigerio, L. (2007). Coated vesicles in plant cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* *18*, 471-478.

Pelham, H.R. (2001). SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol.* *11*, 99-101.

Pfeffer, S.R. (2013). A prize for membrane magic. *Cell* *155*, 1203-1206.

Pfeffer, S.R. (2001). Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* *11*, 487-491.

Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G., and Denecke, J. (2001). Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell* *13*, 2005-2020.

Pimpl, P., Hanton, S.L., Taylor, J.P., Pinto-daSilva, L.L., and Denecke, J. (2003). The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell* *15*, 1242-1256.

Popoff, V., Adolf, F., Brugger, B., and Wieland, F. (2011). COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* *3*, a005231.

Richter, S., Voss, U., and Jurgens, G. (2009). Post-Golgi traffic in plants. *Traffic* *10*, 819-828.

Robinson, D.G., Herranz, M.C., Bubeck, J., Pepperkok, R., and Ritzenthaler, C. (2007). Membrane Dynamics in the Early Secretory Pathway. *Crit. Rev. Plant Sci.* *26*, 199-225.

Robinson, D.G., and Pimpl, P. (2014). Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends Plant Sci.* *19*, 134-139.

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

Rothman, J.E., and Wieland, F.T. (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* *272*, 227-234.

Sanderfoot, A.A., Ahmed, S.U., Marty-Mazars, D., Rapoport, I., Kirchhausen, T., Marty, F., and Raikhel, N.V. (1998). A putative vacuolar cargo receptor partially colocalizes with AtPEP12p on a prevacuolar compartment in Arabidopsis roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9920-9925.

Sato, K., and Nakano, A. (2002). Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2518-2532.

Scheel, A.A., and Pelham, H.R. (1996). Purification and characterization of the human KDEL receptor. *Biochemistry* *35*, 10203-10209.

Scheuring, D., Viotti, C., Kruger, F., Kunzl, F., Sturm, S., Bubeck, J., Hillmer, S., Frigerio, L., Robinson, D.G., Pimpl, P., and Schumacher, K. (2011). Multivesicular bodies mature from the trans-Golgi network/early endosome in Arabidopsis. *Plant Cell* *23*, 3463-3481.

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

Semenza, J.C., Hardwick, K.G., Dean, N., and Pelham, H.R. (1990). ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell* *61*, 1349-1357.

Sevier, C.S., Weisz, O.A., Davis, M., and Machamer, C.E. (2000). Efficient export of the vesicular stomatitis virus G protein from the endoplasmic reticulum requires a signal in the cytoplasmic tail that includes both tyrosine-based and di-acidic motifs. *Mol. Biol. Cell* *11*, 13-22.

Shen, J., Zeng, Y., Zhuang, X., Sun, L., Yao, X., Pimpl, P., and Jiang, L. (2013). Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol. Plant.* *6*, 1419-1437.

Simpson, J.C., Nilsson, T., and Pepperkok, R. (2006). Biogenesis of tubular ER-to-Golgi transport intermediates. *Mol. Biol. Cell* *17*, 723-737.

Strating, J.R., and Martens, G.J. (2009). The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface. *Biol. Cell.* *101*, 495-509.

Strating, J.R., van Bakel, N.H., Leunissen, J.A., and Martens, G.J. (2009). A comprehensive overview of the vertebrate p24 family: identification of a novel tissue-specifically expressed member. *Mol. Biol. Evol.* *26*, 1707-1714.

Sztul, E., and Lupashin, V. (2009). Role of vesicle tethering factors in the ER-Golgi membrane traffic. *FEBS Lett.* *583*, 3770-3783.

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

Teasdale, R.D., and Jackson, M.R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *12*, 27-54.

Townsley, F.M., Wilson, D.W., and Pelham, H.R. (1993). Mutational analysis of the human KDEL receptor: distinct structural requirements for Golgi retention, ligand binding and retrograde transport. *EMBO J.* *12*, 2821-2829.

Vetrivel, K.S., Gong, P., Bowen, J.W., Cheng, H., Chen, Y., Carter, M., Nguyen, P.D., Placanica, L., Wieland, F.T., Li, Y.M., Kounnas, M.Z., and Thinakaran, G. (2007). Dual roles of the transmembrane protein p23/TMP21 in the modulation of amyloid precursor protein metabolism. *Mol. Neurodegener* *2*, 4.

Votsmeier, C., and Gallwitz, D. (2001). An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J.* *20*, 6742-6750.

Wada, I., Rindress, D., Cameron, P.H., Ou, W.J., Doherty, J.J.,^{2nd}, Louvard, D., Bell, A.W., Dignard, D., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J. (1991). SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* *266*, 19599-19610.

Wang, J., Ding, Y., Wang, J., Hillmer, S., Miao, Y., Lo, S.W., Wang, X., Robinson, D.G., and Jiang, L. (2010). EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in Arabidopsis and tobacco cells. *Plant Cell* *22*, 4009-4030.

Wen, C., and Greenwald, I. (1999). p24 proteins and quality control of LIN-12 and GLP-1 trafficking in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* *145*, 1165-1175.

Wilson, D.W., Lewis, M.J., and Pelham, H.R. (1993). pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. *J. Biol. Chem.* *268*, 7465-7468.

Woollard, A.A., and Moore, I. (2008). The functions of Rab GTPases in plant membrane traffic. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 610-619.

Xu, G., Li, S., Xie, K., Zhang, Q., Wang, Y., Tang, Y., Liu, D., Hong, Y., He, C., and Liu, Y. (2012). Plant ERD2-like proteins function as endoplasmic reticulum luminal protein receptors and participate in programmed cell death during innate immunity. *Plant J.* *72*, 57-69.

Xu, G., and Liu, Y. (2012). Plant ERD2s self-interact and interact with GTPase-activating proteins and ADP-ribosylation factor 1. *Plant. Signal. Behav.* *7*, 1092-1094.

Yang, Y.D., Elamawi, R., Bubeck, J., Pepperkok, R., Ritzenthaler, C., and Robinson, D.G. (2005). Dynamics of COPII vesicles and the Golgi apparatus in cultured *Nicotiana tabacum* BY-2

cells provides evidence for transient association of Golgi stacks with endoplasmic reticulum exit sites. *Plant Cell* *17*, 1513-1531.

Yuasa, K., Toyooka, K., Fukuda, H., and Matsuoka, K. (2005). Membrane-anchored prolyl hydroxylase with an export signal from the endoplasmic reticulum. *Plant J.* *41*, 81-94.

Zhang, L., and Volchuk, A. (2010). P24 Family Type 1 Transmembrane Proteins are Required for Insulin Biosynthesis and Secretion in Pancreatic Beta-Cells. *FEBS Lett.* *584*, 2298-2304.

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* *136*, 2621-2632.