


**MÁSTER en INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
TRASLACIONAL**

**INICIACIÓN DE LA
CARACTERIZACIÓN
del INTERACTOMA
de la GTPasa Rab18**

DIRECTORES del TRABAJO:



**Prof. Dr. María del Mar
Malagón Poyato**



**Prof. Dr. Rafael
Vázquez Martínez**

**Realizado por:
BEATRIZ PERALTA MATARREDONA**

ABREVIATURAS

RE	Retículo Endoplásmico
TGN	Red trans del Complejo de Golgi
ERGIC	Compartimento Intermediario Golgi-Retículo
ISGs	Gránulos de Secreción Inmaduros
MSGs	Gránulos de Secreción Maduros
GEFs	Factores Intercambiadores nucleótidos de Guanina
GAPs	Proteínas Activadoras de GTPasas
RabGDI	Inhibidor Disociación Rab-GDP
GDF	Factores desplazantes de GDI.
GFP	Proteína Verde Fluorescente
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
GH	Hormona del Crecimiento
LROs	Orgánulos Relacionados con Lisosomas
LMPs	Proteínas Integrales de Membrana Lisosomales
HSP	Síndrome de Hermansky–Pudlak
NPY	Neuropéptido Y
DCGs	Gránulos de Secreción Electrodensos

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

- 1.- Tráfico Intracelular de Proteínas:
 - 1.1 La Ruta Secretora.
 - 1.2 Clasificación y tráfico de las proteínas de secreción.
- 2.- Biogénesis de los Gránulos de Secreción.
- 3.- Biogénesis Lisosomal:
 - 3.1 Aspectos Generales.
 - 3.2 Tráfico de Membrana en los Lisosomas.
 - 3.3 Biogénesis de los Complejos de Orgánulos Relacionados con Lisosomas (BLOCs).
 - 3.4 Complejo 1 de Biogénesis de Orgánulos Relacionados con Lisosomas (BLOC-1).
 - 3.4.1 Interactoma de BLOC-1.
 - 3.4.2 Descripción detallada de las subunidades del complejo BLOC1 en estudio.
- 4.- La Familia de Proteínas Rab-GTPasas:
 - 4.1 Aspectos Generales.
 - 4.2 Características estructurales y funcionales.
 - 4.3 GTPasa Rab18.

MATERIAL y MÉTODOS

- 1.- Cultivos Celulares.
- 2.- Construcción de plásmidos reporteros y transfección celular.
- 3.- Inmunocitoquímica.
- 4.- Microscopía Confocal.
- 5.- Procesamiento y Análisis de Imágenes.

RESULTADOS

1.- Colocalización del mutante activo de Rab18(Q67L) y el marcador de gránulos de secreción NPY.

2.- Colocalización de Rab18 endógena con dos subunidades del complejo BLOC1 (pallidin y dysbindin-II).

2.1 Localización subcelular de posibles efectores de Rab18.

3.-Análisis del papel de la red de microtúbulos en el reclutamiento de Rab18 hacia los gránulos de secreción.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

Estudios previos han establecido que las Rab GTPasas funcionan como proteínas que aseguran la eficiencia y especificidad de la selección del cargo, la dirección del movimiento de las vesículas y su fusión con las membranasceptoras dentro de la ruta de secreción regulada. En concreto, nuestro laboratorio ha demostrado que Rab18 se une a gránulos de secreción e impide su movimiento hacia la membrana plasmática en respuesta a estímulos extracelulares. Además, estudios de doble híbrido de levadura han mostrado que Rab18 puede interactuar con los componentes de BLOC1 (pallidin y dysbindin-II), complejo multiproteico que participa en la biogénesis de lisosomas y otros orgánulos relacionados con la ruta endolisosomal. En este trabajo se han llevado a cabo diversas aproximaciones experimentales encaminadas a profundizar en el significado biológico de la interacción de Rab18 con los gránulos de secreción, así como a confirmar su posible interacción con componentes del complejo BLOC1, pallidin y dysbindin-II, en células de feocromocitoma de rata PC12 mediante microscopía confocal. Así, encontramos que existe una relación espacial entre Rab18 y los componentes estudiados del complejo BLOC1. Por otra parte, demostramos que la asociación de Rab18 a sus gránulos diana depende de la red de microtúbulos, ya que se inhibió tras el tratamiento de las células con un agente despolimerizador de microtúbulos (nocodazol), sin que éste afectara a la biogénesis de los gránulos de secreción. Estos hallazgos sugieren que Rab18 se asocia a gránulos de secreción en un proceso dependiente de microtúbulos, o proteínas asociadas a éstos. Por otra parte, su interacción con componentes del complejo BLOC1 sugiere que Rab18 podría facilitar la clasificación y/o empaquetamiento de enzimas lisosomales incluidas en gránulos de secreción recién formados para su transporte selectivo hacia el sistema endolisosomal.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo son:

- 1.-** Profundizar en el significado biológico de la interacción de Rab18 con gránulos de secreción.
- 2.-** Confirmar la posible interacción de Rab18 con los componentes del complejo BLOC1, pallidin y dysbindin-II, y profundizar en la relación espacial y funcional entre estas proteínas en el contexto de la biogénesis de lisosomas y la ruta de secreción regulada.

INTRODUCCIÓN

1.- Tráfico intracelular de proteínas

1.1. La ruta secretora

La ruta de secreción es un proceso complejo que comprende numerosas etapas en las que participan de manera secuencial diferentes procesos celulares: síntesis de proteínas, maduración post-traducciona, clasificación en vesículas de secreción y su envío controlado hacia su destino final [1]. Las proteínas transportadas a lo largo de la ruta secretora son sintetizadas por ribosomas asociados a la membrana del retículo endoplásmico (RE) y translocadas al lumen de este orgánulo. Una vez en el RE, las proteínas se pliegan adquiriendo su conformación funcional, se clasifican y empaquetan en vesículas de transporte que pasan a través del compartimento intermediario Golgi-RE (ERGIC) [Figura 1] y desembocan en las cisternas *cis* del Complejo de Golgi. En las cisternas más distales, la red *trans* del Golgi (TGN), las proteínas son clasificadas de nuevo y empaquetadas en diferentes tipos de vesículas que, de acuerdo al destino de las proteínas [2], puede clasificarse en:

-Ruta de secreción constitutiva: tiene lugar en todos los tipos celulares y es la encargada de la continua reposición de lípidos y proteínas a la membrana plasmática y a la matriz extracelular.

-Ruta de secreción regulada: es un sello distintivo de células excitables; comprende diferentes pasos secuenciales, que incluyen la síntesis de proteínas asociadas al RE, su modificación post-traducciona, la clasificación y el empaquetado de las proteínas en vesículas de transporte y el tráfico específico hacia sus compartimentos diana

-Ruta endolisosomal: las proteínas destinadas a los lisosomas (hidrolasas ácidas) son reconocidas y modificadas en la red *cis* del Golgi, mediante la adición de un grupo de manosa-6-fosfato que es capaz de separar las hidrolasas lisosomales del resto de las moléculas, el cual es reconocido por el receptor de manosa-6-fosfato (M6PR) en el TGN y transportadas hacia los lisosomas mediante vesículas de transporte recubiertas de clatrina [3].

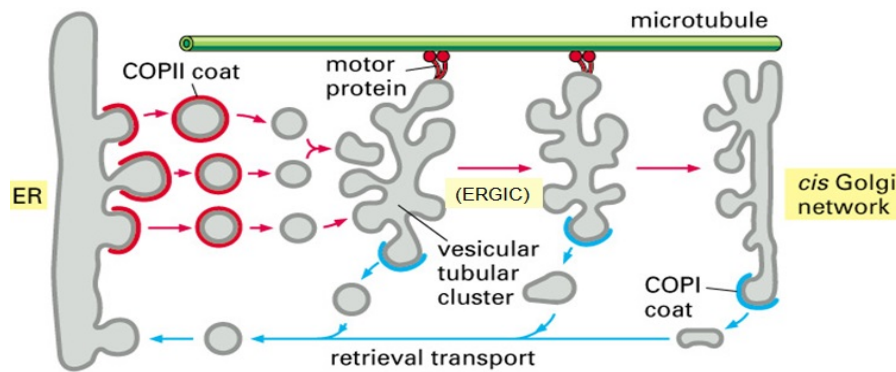


Figura 1. Después del correcto plegamiento y ensamblado, las proteínas destinadas a la ruta secretora se separan selectivamente de las proteínas residentes en el RE. Este proceso ocurre en regiones específicas de salida del RE, que corresponden a subdominios de membrana altamente organizados y dispersos en la superficie del RE y en regiones adyacentes. Este Compartimento Intermediario ER/Golgi (ERGIC) actúa como una estructura dinámica entre el RE y el Golgi[6].

La transferencia de proteínas entre los diferentes compartimentos de la ruta de secreción está mediada por las vesículas de transporte, comprendiendo varias etapas: los complejos de cubierta forman las vesículas de transporte, las cuales pierden la cubierta proteica y se movilizan hacia el compartimento aceptor gracias a su asociación con proteínas motoras que interactúan y se mueven a lo largo de las redes del citoesqueleto celular. Cerca del compartimento aceptor, las vesículas se unen de manera transitoria a la membrana aceptor mediante complejos multifactoriales, anclándose, fusionándose y permitiendo la descarga de su contenido al compartimento [4]. Estos procesos se encuentran controlados por proteínas que aseguran la eficiencia y especificidad de la selección del cargo, así como la dirección de movimiento de las vesículas y su fusión con las membranas aceptoras. Entre estas proteínas podemos mencionar los factores de anclaje, complejos v-SNARE y t-SNARE y proteínas Rab GTPasas [2,5].

1.2. Clasificación y tráfico de las proteínas de secreción

Para explicar los procesos de clasificación de las proteínas en el TGN se han propuesto dos modelos. El primero y más popular, la hipótesis *sorting-for-entry*, propone al TGN como el compartimento donde tiene lugar la clasificación de proteínas de secreción [7,8,9,10]. Según este modelo, las proteínas serían clasificadas mediante su interacción con receptores de clasificación que reconocerían un amplio espectro de proteínas de secreción, las cuales serían empaquetadas en gránulos de secreción de nueva formación o inmaduros (ISGs). Este proceso requiere que un solo receptor de clasificación sea capaz de empaquetar en los gránulos de secreción nacientes un número importante de proteínas de secreción al mismo tiempo.

El otro modelo que explicaría la clasificación de proteínas, el modelo de *sorting-by-retention*, fue propuesto a partir de los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo en

células β -pancreáticas. En estas células, la insulina forma agregados tras su empaquetamiento en ISGs, lo que condujo a proponer que, en lugar de una clasificación activa de proteínas en el TGN, la mayor parte del proceso de clasificación tendría lugar en ISGs post-Golgi. Según este modelo, el TGN actuaría como un compartimento de clasificación no selectivo que daría lugar a ISGs con proteínas de secreción regulada y constitutiva. Este último grupo de proteínas sería excluido de los ISGs gracias a su unión a receptores de clasificación y/o a sus ineficientes propiedades de retención [7,8,11].

Independientemente del modelo de clasificación que se lleve a cabo, una de las cuestiones más elusivas en Biología Celular es cómo la célula es capaz de reconocer, separar y empaquetar proteínas con un destino determinado en vesículas de secreción concretas. En el caso de la clasificación y empaquetamiento de proteínas de secreción regulada, este proceso ocurre como se explica a continuación.

2.- Biogénesis de los gránulos de secreción

Los gránulos de secreción se encuentran en todas las células exocrinas, endocrinas, neuroendocrinas y neuronales. La formación de estas vesículas se inicia en el TGN, dando como resultado la secreción de proteínas empaquetadas de forma concentrada en los gránulos secretores. La exocitosis no estimulada de estos gránulos se produce en niveles bajos, pero la secreción regulada a través de estímulos externos desencadena la fusión de numerosos gránulos de secreción con la membrana plasmática [10,12].

La vía secretora regulada es única para células endocrinas, neuronales y exocrinas [Figura 2]. Desde que Bennett describió por primera vez la formación de los gránulos de secreción en células cromafines en 1941, se ha aprendido mucho sobre su proceso de biogénesis. Este proceso implica la gemación de los gránulos secretores inmaduros (ISGs) desde el TGN, seguido por una serie de pasos de maduración para formar los gránulos secretores maduros (MSGs). Estos incluyen la acidificación de los ISGs recién formados para activar las convertasas de prohormonas y carboxipeptidasas necesarias para el procesamiento de las proteínas de la vía de secreción regulada, la eliminación de las proteínas secretoras constitutivas y las enzimas lisosomales erróneamente empaquetadas en ISGs, la pérdida de la cubierta de clatrina y otras proteínas de los ISGs y la eliminación de agua y la condensación del contenido de los gránulos para formar los MSGs. Los MSGs a continuación, se mueven hacia la superficie celular, donde esperan un estímulo extracelular que induzca su fusión con la membrana plasmática y la liberación de su contenido [Figura 2 ,13].

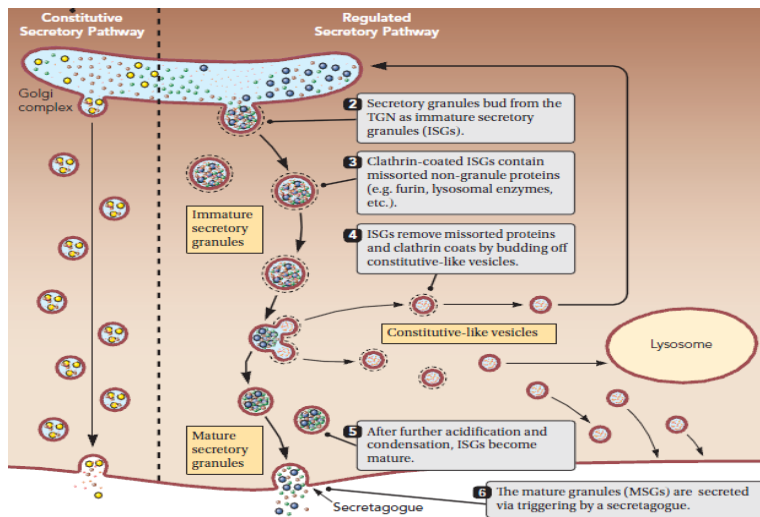


Figura 2. Diferentes etapas en la biogénesis de granulos de secreción. Dos vías de secreción distintas están presentes en células neuroendocrinas: la secreción constitutiva y la secreción regulada [13].

Como se ha mencionado, en un momento concreto del proceso, los ISGs contienen proteínas no destinadas a la ruta de secreción regulada que deben ser excluidas específicamente de estos granulos, permitiéndole su maduración. Entre ellas, se pueden encontrar enzimas lisosomales. Estas proteínas deben pues ser excluidas de los ISGs y transportadas específicamente hacia los lisosomas.

Los lisosomas son orgánulos dinámicos que gestionan la degradación de productos procedentes de las rutas endocítica, fagocítica y autofágica. La función de los lisosomas no se limita a la degradación de proteínas, también se fusionan con la membrana plasmática en respuesta a la lesión celular o a un aumento en la concentración citosólica de calcio, así como también pueden tener funciones secretoras más especializadas en algunos tipos celulares [14,15]. La función de los lisosomas se complementa con los orgánulos relacionados con lisosomas (LROs), tales como melanosomas, granulos líticos, complejo mayor de histocompatibilidad de clase II y granulos densos de las plaquetas.

3.- Biogénesis de lisosomas

3.1. Aspectos generales

El transporte de las proteínas lisosomales recién sintetizadas puede ser directo, a partir de la TGN al sistema endosomal, o indirecto lo que implica el transporte a la membrana plasmática y la posterior endocitosis. La vía directa se efectúa mediante el transporte de hidrolasas lisosomales a través del receptor de manosa-6-fosfato. Por el contrario, se sabe muy poco acerca de los mecanismos estructurales y moleculares para el transporte de las metaloproteínas lisosomales hacia lisosomas [16]. El endosoma temprano es el principal compartimento de clasificación de la vía endocítica, en el que muchos ligandos se disocian de sus receptores en el pH ácido de la luz y

muchos receptores se reciclan a la superficie celular [17].

La vía endocítica de degradación se basa en un intercambio constante de entrada y salida de las membranas y múltiples eventos de fusión resultan en la remodelación gradual de un intermediario endosomal en una etapa endosomal posterior, un proceso llamado maduración [16, Figura 3].

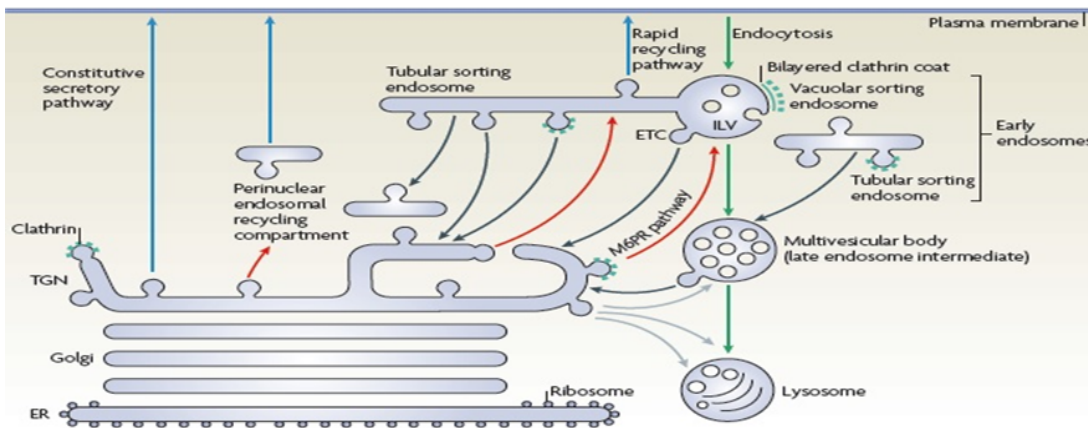


Figura 3. La biogénesis lisosomal requiere la participación concertada de las vías biosintética y endocítica. Los lisosomas reciben la carga destinada a la degradación, así como nuevas proteínas lisosomales recién sintetizadas por la vía endocítica (flechas verdes). Desde la TGN, las enzimas lisosomales pueden seguir la vía secretora constitutiva (flechas azules) a la MP y, posteriormente, llegar a lisosomas por endocitosis. Además, las proteínas lisosómicas pueden seguir una vía intracelular directa (flechas rojas) para el sistema endolisosomal. La vía intracelular directa mejor caracterizada es el transporte dependiente de clatrina de hidrolasas lisosomales por los receptores de manosa-6-fosfato (M6PRs). La literatura disponible sugiere que hay múltiples vías para ambos hidrolasas lisosomales y proteínas de membrana lisosomal, que pueden entrar en la vía endolisosomal en las distintas etapas de la maduración (flechas grises). Las flechas negras representan múltiples vías retrógradas de endosomas [16].

Existen tres hipótesis alternativas para explicar la biogénesis de lisosomas: la primera implica el transporte vesicular entre los dos orgánulos por analogía con muchos pasos del tráfico de membrana intracelular, tanto de la vía endocítica como con la vía secretora [17].

La segunda hipótesis se denomina “kiss and run”. Storrie y Desjardins (1996) propusieron esta hipótesis debido al descubrimiento de un orgánulo híbrido encargado del almacenamiento de hidrolasas ácidas y fusionable con endosomas tardíos. No obstante, la presencia de hidrolasas activas en endosomas tardíos, llevó a pensar que el orgánulo híbrido podría actuar como el principal lugar para la hidrólisis de macromoléculas endocitadas. Los lisosomas se separan de los orgánulos híbridos por un proceso de maduración que incluye la condensación de los contenidos y la eliminación de algunas proteínas de la membrana y el contenido soluble, análogo a lo que ocurre durante la maduración de ISGs [18].

La tercera hipótesis implica la fusión directa y completa entre endosomas tardíos y

lisosomas con la posterior recuperación de los lisosomas para su reutilización. Esta hipótesis puede considerarse como una extensión del “kiss and run”. Como morfológicamente se parecen a los gránulos de secreción, se especuló que su función era almacenar las enzimas lisosomales maduras y se propuso que se fusionan periódicamente con endosomas tardíos de una manera regulada para formar un compartimiento, 'el estómago celular', en el que se produce los procesos de degradación. Aunque aún no existen pruebas directas que apoyen esta hipótesis, hay una clara evidencia de la fusión directa de estos orgánulos [17].

3.2. Tráfico de membrana hacia los lisosomas.

Los lisosomas son orgánulos dinámicos que reciben la entrada del tráfico de membrana procedente de las vías biosintética, endocítica y autofágica. Pueden ser considerados como orgánulos de almacenamiento de hidrolasas ácidas y son capaces de fusionarse con endosomas tardíos para formar orgánulos híbridos donde se produce la digestión de las macromoléculas endocitadas [18,19].

Hay tres rutas bien descritas en la entrega de macromoléculas a los lisosomas, tal y como podemos observar en la Figura 4.

- Endocitosis: en la vía endocítica convencional, sigue habiendo disputas sobre si el tráfico de membrana a partir de endosomas tempranos y tardíos se produce a través de la maduración o mediante la formación de una vesícula endocítica portadora, como resultado de la captación por endosomas tempranos de una isoforma de COP-I responsable del tráfico retrógrado. Como se describió anteriormente, eventos de “kiss and run” y fusión directa entre endosomas tardíos y lisosomas, proporciona los principales medios de entrega a los lisosomas. La morfología general de compartimentos endosomales es consecuencia de los eventos de fusión que se producen en la vía endocítica, en particular, fusiones homotípicas de endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas, así como fusiones heterotípicas entre vesículas endocíticas y endosomas tempranos, vesículas endocíticas y endosomas tardíos y endosomas tardíos y lisosomas [18].

- Ruta biosintética: las hidrolasas ácidas sintetizadas se entregan a los lisosomas después de ser etiquetadas con manosa 6-fosfato en la cara cis del complejo de Golgi y de unirse a los receptores de manosa-6-fosfato en la TGN. Las hidrolasas enlazadas se entregan primero a los endosomas, donde se disocian de los receptores como resultado del pH de la luz ácida, permitiendo el regreso de los receptores a la TGN para su reciclaje. Eventos de fusión entre endosomas y lisosomas preexistentes pueden ser los principales mediadores de la entrega de los endosomas a los lisosomas. Hasta hace poco, se pensaba que los receptores de manosa-6-fosfato eran reclutados en depresiones

revestidas de clatrina en el TGN por medio de la proteína adaptadora AP-1; este adaptador es uno de los cuatro: AP-1, AP-2 (utilizado en depresiones revestidas de clatrina en la MP), AP-3 y AP-4. Todos estos adaptadores son proteínas utilizadas en la vía post-Golgi secretora y vía endocítica [17,18].

- Autofagia: cuando se produce escasez de nutrientes, se estimula el proceso de la autofagia, lo que resulta en el recubrimiento de una parte del citoplasma por la membrana para formar un autofagosoma que es capaz de fusionarse con los lisosomas [18].

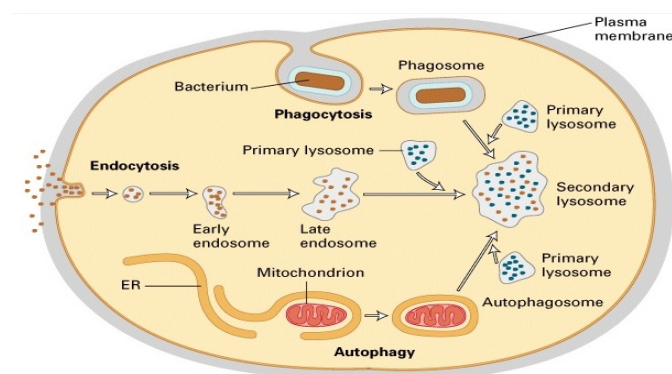


Figura 4. Principales rutas de tráfico molecular hacia los lisosomas [18].

3.3. Papel de los complejos BLOC en la biogénesis de lisosomas

Los orgánulos relacionados con lisosomas (LORs) están presentes en un amplio rango de tipos celulares e incluyen gránulos líticos, cuerpos lamelares pulmonares, gránulos densos de las plaquetas y melanosomas, siendo estos últimos los mejor estudiados hasta el momento. La biogénesis de los melanosomas y otros LROs requiere el complejo de proteína adaptadora AP-3 y tres complejos de biogénesis de orgánulos relacionados con lisosomas (BLOC). Los componentes de los complejos BLOC fueron descubiertos a partir del análisis genético del síndrome de Hermansky-Pudlak (HPS) humano y de los fenotipos de pigmentación en ratones. BLOC1, BLOC2 y BLOC3 contienen ocho, tres y dos subunidades, respectivamente. Las funciones a nivel molecular de los complejos BLOC siguen siendo uno de los problemas no resueltos centrales de la biogénesis de LROs [20]. Varios estudios han demostrado que los tres bloques se han encontrado de forma soluble en el citosol, así como asociados a las membranas.

La formación defectuosa de LROs subyace a la enfermedad humana de Hermansky-Pudlak (HPS). Es una enfermedad autosómica recesiva rara que se caracteriza por reducción de piel, pelo, pigmentación de los ojos y diátesis hemorrágica; en ocasiones se producen síntomas adicionales, como la fibrosis pulmonar, colitis granulomatosa o neutropenia. Hasta la fecha, se han identificado

nueve subtipos de HPS en humanos (HPS 1-9) y sus genes asociados. Todos los productos de proteínas de HPS están implicados en la biogénesis de LROs, tales como melanosomas en melanocitos y gránulos delta en plaquetas, y todos son componentes de uno de los cuatro complejos de proteínas: BLOC1, BLOC2, BLOC3 o AP-3 [21, Figura 5].

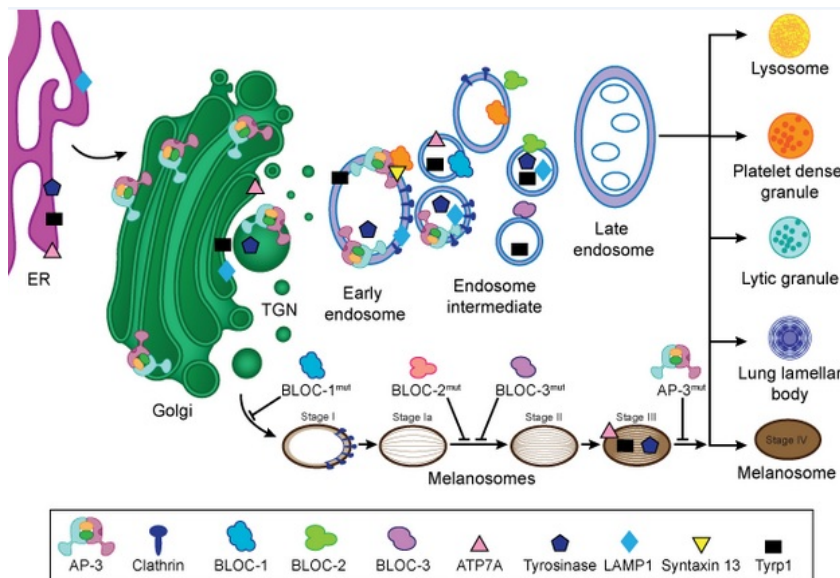


Figura 5. Las proteínas HPS forman varios complejos de proteínas (AP-3, BLOC1, BLOC2 y BLOC3) que están involucrados en el tráfico de proteínas a LROs desde el TGN y afectan a la síntesis de estos orgánulos. Complejos HPS particulares pueden afectar sólo a un subconjunto de LROs. Se cree que BLOC1 y AP-3 median los primeros pasos de tráfico de vesículas de endosomas tempranos, mientras BLOC2 y BLOC3 es probable que participen en las etapas posteriores. Los estudios han demostrado interacciones físicas entre BLOC1 y AP-3, y BLOC1 y BLOC2. Sólo se muestran las

principales proteínas afectadas por cada complejo HPS (ATP7A, tirosinasa, Tyrp1, LAMP1). BLOC1 se sabe que se une a la proteína de fusión de vesícula, syntaxina 13, que se localiza en la etapa I (melanosomas recubierto de endosomas). BLOC2 y AP-3 pueden interactuar con clatrina. La maduración de los melanosomas se muestra por separado, junto con las etapas afectadas por mutaciones en cada complejo de HPS. Las mutaciones en la subunidad d del complejo AP-3 afectan a la maduración de los melanosomas entre las etapas III y IV [21].

BLOC1 contiene ocho subunidades proteicas: pallidin, muted, dysbindin, cappuccino, snapin, BLOS1, BLOS2 y BLOS3. BLOC2 tiene al menos tres subunidades, HPS3, HPS5 y HPS6. BLOC3 consta, al menos, de HPS1 y HPS4. Se ha demostrado que están involucrados en el transporte endosomal a través de la interacción entre los complejos o la acción secuencial entre ellos. Una mejor comprensión de sus funciones biológicas requiere la disección de los mecanismos de ensamblaje de cada complejo y las interacciones de cada subunidad BLOC. Las interacciones entre complejos se pueden dividir en dos categorías: intra-complejo, se refiere a la interacción entre subunidades dentro de un complejo y/o extra-complejo, donde la interacción representa la unión de una subunidad de un complejo con otras proteínas fuera del complejo para jugar papeles fisiológicos importantes. Estas interacciones forman una red en el transporte endosomal para ejecutar varias funciones fisiológicas [22] que serán explicadas a continuación.

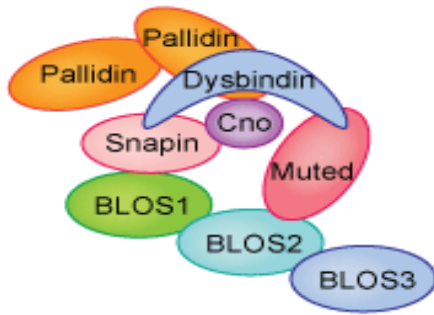


Figura 6. Componentes del complejo 1 de biogénesis de orgánulos relacionados con lisosomas (BLOC1). Se compone de muted, snapin, capuccino, dysbindin, BLOS1, BLOS2, BLOS3 y dos subunidades de pallidin. Se muestran las interacciones físicas directas entre las diferentes subunidades, según lo determinado por el ensayo en levaduras de dos híbridos. Todas estas subunidades, excepto BLOS3, contienen regiones coil-coil implicadas en las interacciones proteína-proteína [23].

Esta "red BLOC" no es un complejo estático, sino dinámico (temporal y espacialmente). Es probable que estos complejos lanzadera de ida y vuelta actúen entre los endosomas, citosol y el citoesqueleto durante la gemación de vesículas, el movimiento y la fusión. También puede existir una red BLOC específica de tejidos o especie. Por lo tanto, la apariencia física de una "red BLOC" depende del método de purificación, especie, tipo de célula y el estado [22].

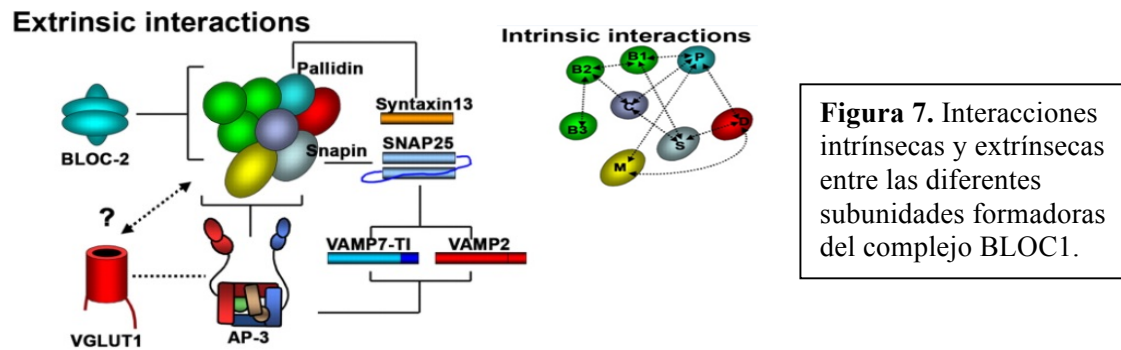
BLOC1 se localiza en endosomas tempranos y promueve el tráfico de proteínas específicas desde estos orgánulos a LROs y vesículas sinápticas. Actualmente se desconoce cómo BLOC1 interviene en la clasificación de proteínas de estos compartimentos. BLOC1 en mamíferos se compone de 8 subunidades, algunas de las cuales parecen estar ampliamente conservadas en eucariotas, lo que sugiere que BLOC1 es un antiguo regulador del tráfico intracelular [22].

3.4.1. Interactoma de BLOC1

Interacciones intra-complejo: la identificación de pallidin y muted facilitó el descubrimiento del complejo de proteínas BLOC1. Aunque no se observó ninguna interacción específica entre pallidin humana y muted en ensayos de levaduras de doble híbrido, experimentos de co-inmunoprecipitación confirmaron que tanto pallidin como muted son subunidades de BLOC1. Del mismo modo, la proteína capuccino fue identificada como la tercera subunidad de BLOC1 por co-precipitación y co-sedimentación. Dysbindin fue identificada como la cuarta subunidad de BLOC1, interactuando y uniéndose con pallidin y muted. Experimentos de cromatografía demostraron que estas tres proteínas co-residen en el complejo BLOC1 con una masa molecular estimada de 221-247 kD. Se llevaron a cabo enfoques bioquímicos para identificar las subunidades desconocidas de BLOC1, apareciendo cuatro subunidades adicionales: snapin, BLOS1, BLOS2 y BLOS3. Diversos experimentos de coimmunoprecipitación y cosedimentación confirmaron que BLOS3 interactúa con pallidin, capuchino y muted. Una vez descubiertas estas 8 subunidades, ciertos autores se preguntaron si habían sido identificadas todas las subunidades del complejo. La masa molecular teórica de BLOC1 si el complejo contiene una copia de cada uno de las 8 subunidades conocidas sería de 170,4 kD. Por tanto, es posible que BLOC1 pudiera contener más de una copia de algunas

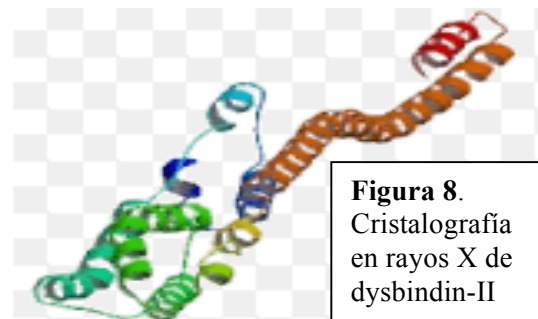
de las subunidades conocidas o subunidades adicionales no identificadas [22, Figura 7].

Interacciones extra-complejo: cada subunidad de BLOC1 puede tener funciones fisiológicas adicionales a través de sus asociaciones de interacción con otras moléculas fuera del complejo. Dysbindin, snapin y pallidin son bien conocidas por estar implicadas en estas interacciones complejas, las cuales proporcionan nuevos conocimientos sobre la posible función molecular de BLOC1 [22, Figura 7].



3.4.2 Descripción detallada de las subunidades del complejo BLOC1 en estudio:

► **Dysbindin-II** → se sabe que BLOC-1 se asocia con el complejo AP-3 física y funcionalmente. El complejo AP-3 está involucrado en la formación de los LROs y un subconjunto de vesículas sinápticas tales como la proteína relacionada con la tirosinasa 1, proteína de membrana de los melanosomas, proteínas asociadas a la membrana lisosomal y transportador 3 de zinc. BLOC-1 se asocia con el complejo AP-3 a través de la interacción directa de Dysbindin-II con la subunidad μ del complejo AP-3 [26].



Las diferentes isoformas se localizan en compartimentos subcelulares: isoforma I se localiza en la membrana de la vesícula citoplasmática, membrana de endosomas y membrana de melanosomas; se detecta en axones y dendritas de células neuronales y en elementos túbulo-vesiculares en las proximidades del G y de melanosomas; se expresa en la corteza cerebral, hipocampo y frontal. La isoforma II, la que nosotros estudiaremos en este trabajo, se localiza en la membrana de la vesícula sináptica y/o citoplasmática, membrana de endosomas y de melanosomas [24].

Dysbindin-II se identificó hace 10 años como una proteína de expresión ubicua de función desconocida, procediéndose a la cristalización de su estructura tridimensional, tal y como se muestra en la figura 8. En los años siguientes, la proteína y el gen que la codifica, DTNBP2, se han convertido en el foco de una intensa investigación por pruebas genéticas e histopatológicas que sugieren un papel potencial en la patogénesis de la esquizofrenia. En el cerebro, sin embargo, dysbindin-II se asocia a múltiples complejos para desempeñar una amplia variedad de funciones, incluyendo regulación de la transcripción de neuritas, la formación de la espina dendrítica, biogénesis y exocitosis de la vesícula sináptica y el tráfico de receptores de glutamato y dopamina [25]. Expresión de dysbindin-II se reduce en hipocampo y áreas corticales de los pacientes con esquizofrenia, destacando la relevancia de DTNBP2 y dysbindin-II en las vías moleculares que conducen a la esquizofrenia. Las vesículas que contienen BLOC1 y AP-3 participan en una ruta celular que culmina con la entrega de la carga entre los endosomas tempranos y el sistema endosomas tardíos/lisosomas [27].

Dysbindin-II interactúa con α -/ β -dystrobrevins y distrofina en ensayos de dos híbridos en levaduras, coimmunoprecipitación y colocalización, indicando que dysbindin-II se asocia con el complejo proteico asociado a la distrofina. Dysbindin-II fue separado de α -/ β -dystrobrevins y distrofina por cromatografía de exclusión de tamaño o cosedimentación, lo que indica que las dystrobrevins no son subunidades de BLOC1. La misma región de 69 residuos del primer dominio de dysbindin-II que se une a dystrobrevin in vitro contiene los sitios de unión para pallidin y snapin, y al menos parte de la región de unión a muted. Sin embargo, los estudios in vivo revelaron que dysbindin-II ensamblada en BLOC1 no es un compañero de unión fisiológico de dystrobrevins. Es probable que la unión de dysbindin-II a pallidin u otras subunidades de BLOC1 desplazan constitutivamente a dystrobrevin, o que diferentes isoformas de dysbindin-II interactúan con diferentes subunidades [24,30].

► **Pallidin** → clonación del gen PLDN reveló que pallidin es una nueva proteína de 172 residuos de aminoácidos, habiéndose descubierto y cristalizado su estructura tal y como se muestra en la Figura 9. Ensayos de dos híbridos en levaduras e inmunoprecipitación demostraron que pallidin interactúa con syntaxin 13, una

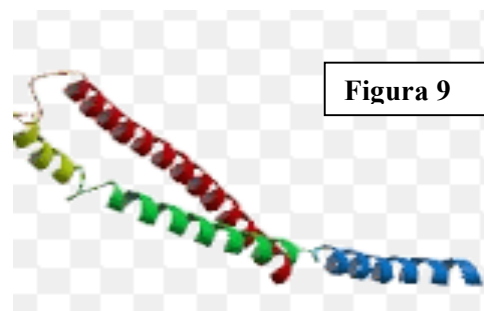


Figura 9

proteína t-SNARE involucrada en el acoplamiento y fusión de vesículas entre endosomas tempranos y endosomas de reciclaje. Esta interacción sugiere que pallidin podría estar implicada en una operación de fusión de vesículas de melanosomas y gránulos densos de plaquetas. Proteína pallidin

humana tiene un peso molecular de 25 kDa [28]. Mediante el uso de un anticuerpo policlonal de conejo frente a pallidin, se encontró que la proteína existe en una forma soluble y en una forma asociada a la membrana, comportándose como una proteína de membrana periférica [29]. Se localiza en el citoplasma y en el sistema de endomembranas, estando ampliamente expresada a nivel tisular.

4.- La familia de proteínas Rab GTPasas

4.1. Aspectos generales

Las proteínas Rab se incluyen dentro de la superfamilia de proteínas GTPasas de bajo peso molecular Ras. Estas proteínas participan en el control de multitud de etapas del tráfico intracelular de membranas, controlan la biogénesis de las diferentes vesículas de transporte intracelular y actúan como señalizadores intracelulares [31]. Estas GTPasas también confieren especificidad en el direccionamiento correcto de las vesículas de transporte hacia el compartimento aceptor mediante su interacción con motores moleculares, el reclutamiento de estos hacia la superficie de las vesículas y la modulación de la procesividad del motor molecular a lo largo de la red del citoesqueleto [32,33,34].

Las proteínas Rab funcionan como interruptores moleculares regulados, ciclándose entre un estado inactivo en el que la proteína se encuentra unida a GDP y soluble en el citosol, y un estado activo en el que la GTPasa presenta GTP, lo que permite su interacción con membranas intracelulares [35,36,37]. El gran número de funciones que cumplen las GTPasas Rab ha hecho que se acepte la idea de que estas proteínas son constituyentes centrales necesarios para dirigir la organización del sistema de endomembranas, por lo que disfunciones que afectan la síntesis y/o la actividad de estas GTPasas conllevan a la aparición de graves enfermedades humanas [38].

Análisis genómicos han mostrado que la familia de proteínas Rab está compuesta por más de 60 miembros diferentes en humanos [37,38]. Las diferentes GTPasas Rab se localizan en compartimentos distintos y están segregadas en microdominios espacio-temporales específicos [39]. Actúan en conjunción con un amplio rango de proteínas accesorias (efectores de proteínas Rab) que bien regulan la actividad de las proteínas Rab o son reguladas por la activación de estas, siendo las responsables de traducir la función específica de la proteína Rab en la maquinaria molecular que dirige el posicionamiento intracelular de vesículas [40].

4.2. Características estructurales y funcionales

La activación de las proteínas Rab mediante el intercambio de GDP por GTP conlleva cambios conformacionales en la estructura terciaria de estas proteínas. Este intercambio está catalizado por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), que debilitan la interacción de GDP con la molécula y facilitan su liberación y la unión de GTP [41]. La elevada proporción de GTP/GDP existente en el citosol permite que el GTP se una con rapidez a la proteína Rab y se produzca la activación y translocación de ésta a su correspondiente compartimento diana [Figura 10, 43].

Las Rab GTPasas poseen una capacidad para hidrolizar GTP muy reducida, requiriendo la ayuda de proteínas activadoras de GTPasas (GAPs) para acelerar y hacer eficiente este proceso. Las proteínas GAP se unen a proteínas Rab particulares debido a su localización subcelular específica que puede determinar la interacción de las proteínas GAP con proteínas reguladoras concretas [43]. Las proteínas inhibidoras de la asociación Rab-GDP (RabGDI) previenen la liberación de GDP, estabilizando a la proteína Rab en su forma inactiva, mientras que los factores disociadores de GDI (GDF) reconocen a complejos Rab-RabGDI específicos y promueven la liberación de GDI [42,44].

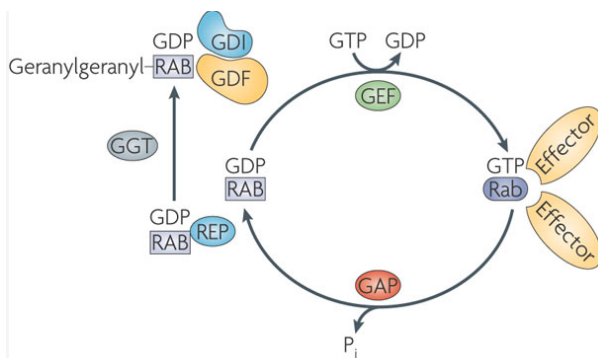


Figura 10: La conversión de Rab-GDP en Rab-GTP se produce a través del intercambio de GDP por GTP, catalizado por un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) que provoca un cambio conformacional en la proteína Rab. La conformación GTP "activa" es reconocida por múltiples proteínas efectoras y se convierte de nuevo a la forma GDP 'inactiva' mediante la hidrólisis de GTP, estimulada por una proteína activadora de GTPasa (GAP). Las proteínas Rab de nueva síntesis, en su forma unida a GDP, son reconocidas por una

proteína Rab escolta (REP), quien las presenta a una geranylgeranil transferasa (GGT). Rab geranylgeranilado unido a GDP es reconocido por una proteína inhibidora de la disociación de Rab-GDP (GDI), que impide que la proteína se una a GTP [43].

4.3. GTPasa Rab18

Desde hace algunos años, nuestro laboratorio se ha centrado en determinar y estudiar las características bioquímicas y funcionales de la proteína Rab18, permitiéndonos descubrir que participa activamente en la ruta de secreción regulada.

Fue clonada a partir de células AtT20 de hipófisis de ratón, obteniéndose que la secuencia de cDNA aislada codifica para una proteína de 23.5 kDa que presenta un dominio de unión a GTP y otros motivos típicos de la familia de proteínas Rab. Diferentes análisis mostraron que se expresa de

manera ubicua, pero más prominente en tejidos neuroendocrinos, incluyendo cerebro e hipófisis [45]. Previamente a su liberación al citosol, Rab18 sufre prenilación y la adición de grupos carboxil-metilo en el dominio hipervariable. Una vez liberada, puede comenzar a ciclarse entre su conformación citosólica inactiva (unida a GDP) y su conformación activa asociada a membrana (unida a GTP) [46].

En cuanto a la localización intracelular de Rab18, estudios de microscopía confocal y electrónica han demostrado que Rab18 se asocia a la superficie de gránulos de secreción en células neuroendocrinas PC12, AtT20 y melanotropas [48], a la superficie de gotas lipídicas en adipocitos [48] y a las membranas de los compartimentos *cis*-Golgi y RE en fibroblastos NRK, Vero y COS7 [47]. Estas observaciones indican que la localización intracelular de Rab18 depende fuertemente del tipo celular considerado, lo que sugiere que esta GTPasa puede cumplir distintas funciones que dependen de la especialización celular y de su posible interacción con proteínas efectoras diferentes.

En lo que respecta a la función de Rab18 en la ruta de secreción regulada, un estudio previo llevado a cabo en este laboratorio sugirió que Rab18 cicla entre el citosol y la superficie de una población discreta de gránulos de secreción en respuesta a la activación de esta ruta [48]. Mediante ingeniería genética se construyeron dos mutantes de Rab18 que presentan sustituciones de aminoácidos específicos en el sitio de unión a GTP y se marcaron con la proteína verde fluorescente (GFP): el mutante Rab18 S22N, deficiente en la unión de GTP y constitutivamente inactivo, y el mutante Rab18 Q67L incapaz de hidrolizar GTP y, por tanto, constitutivamente activo. Experimentos de transfección de células PC12 y AtT20 con las proteínas mutantes demostraron que Rab18 Q67L siempre se encontraba unido a gránulos de secreción en condiciones basales y estimuladas, mientras que el mutante Rab18 S22N permanecía en el citosol incluso tras la estimulación de la secreción hormonal [48].

En relación al papel específico de Rab18 en células neuroendocrinas, en este estudio se demostró que la translocación de la proteína a gránulos de secreción estaba acompañada de una reducción de la respuesta secretora de las células a estímulos extracelulares. Cuando Rab18 silvestre o el mutante constitutivamente activo eran sobreexpresados en células PC12, la tasa de secreción celular en respuesta a un pulso despolarizante de K^+ resultó significativamente menor que en las células control [48,49]. Por tanto, estos datos son consistentes con la idea de que la interacción de Rab18 con gránulos de secreción supondría un freno en el tráfico de gránulos para controlar la cantidad de producto liberado en respuesta a señales extracelulares estimuladoras de la ruta de secreción regulada.

Con el objetivo de identificar las proteínas que interaccionan con Rab18 (efectores) y que son las responsables últimas de traducir la señal de la GTPasa en la ruta de secreción regulada se llevaron a cabo experimentos de doble híbrido de levadura. A partir de estos experimentos se pudieron identificar numerosas proteínas efectoras de Rab18, entre las que se encuentran varios miembros del complejo BLOC1 (i.e. pallidin y dysbindin-II). Estos datos sugieren que Rab18 puede jugar un papel en la biogénesis de lisosomas controlando el reclutamiento y/o ensamblaje del complejo BLOC1. En este trabajo, se ha profundizado en la asociación de Rab18 con gránulos de secreción y analizado la distribución espacial de Rab18 con respecto a pallidin y dysbindin-II en células neuroendocrinas de feocromocitoma de rata PC12. Asimismo, se ha investigado la importancia de la red de microtúbulos en la interacción de Rab18 con los gránulos de secreción.

MATERIAL y MÉTODOS

1.- Cultivos celulares

En el presente trabajo he utilizado la línea celular PC12, procedente de feocromocitoma de rata. Las células fueron cedidas por el Dr. Eduardo Muñoz-Blanco, de la sección de Inmunología del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba. Las células fueron cultivadas en medio DMEM conteniendo glucosa 4,5 g/l y suplementado con: L-glutamina 2 mM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), suero fetal bovino al 5% (v/v) y suero de caballo (Gibco) al 10% (v/v).

Los cultivos de mantenimiento de la línea celular se realizaron en botellas de cultivo de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suiza), previa visualización en el microscopio óptico de cada placa para confirmar que nos encontramos ante una confluencia celular del 70-90% que nos permitirá el subcultivo. Las células se despegaron del fondo de la botella de mantenimiento una vez a la semana utilizando una solución comercial conteniendo tripsina 0,5 g/l y EDTA 0,2 g/l (Sigma). Las células destinadas a inmunocitoquímica y microscopía confocal se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina 100 µg/ml (Sigma) colocados en placas de 35 mm de diámetro (TPP) a una densidad de 20.000 células/cm².

2.- Construcción de plásmidos reporteros y transfección celular

El mutante constitutivamente activo de Rab18 fue construido y clonado en un vector de expresión que codifica la proteína fluorescente DsRed (Clontech) previamente en el laboratorio, mientras que dysbindin-II fue clonada a partir de la secuencia codificante completa del gen de dysbindin-II en rata en un vector que contiene el gen codificante de la proteína fluorescente GFP. c-myc-Pallidin fue cedida generosamente por el Doctor Juan S. Bonifacino (National Institute of Health) y el marcador de gránulos de secreción NPY-GFP fue cedido por el Dr. Thorsten Lang (Max-Planck Institute for Biophysical Chemistry, Gottingen, Alemania).

La introducción de vectores plasmídicos de expresión en la línea celular PC12 se llevó a cabo mediante la técnica de transfección con el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este compuesto lipoproteico permite la formación de poros en la membrana con la consiguiente entrada del material genético al citosol. Las células se transfectaron 2-3 días después de su siembra en las placas de petri, cuando el cultivo alcanzó una densidad

aproximada del 70-80%. Los plásmidos fueron utilizados a una concentración de 1 µg por placa de 35 mm, mientras que la lipofectamina se utilizó a 3µl por placa. Para los experimentos de las subunidades de BLOC1 se sembraron 4 placas (2 placas control y 2 placas con KCl 53mM, que favorece y estimula el intercambio de GDP por GTP necesario para la activación de Rab18) o 2 placas (1 placa control y 1 placa con solución de KCl). Para el experimento de colocación de NPY-GFP/Rab18 se sembraron 4 placas (2 placas control y 2 placas sometidas a un tratamiento de 1 h con el agente despolimerizador de microtúbulos nocodazole (10 µM). Tras la transfección, las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24/48 h, se incubaron durante 30 min en presencia o ausencia de KCl 53 mM, se fijaron con paraformaldehído 4% y se montaron en portaobjetos con una solución de PBS:glicerol 1:1 (v/v).

3.- Inmunocitoquímica

Previamente a la realización de la inmunocitoquímica, las células se lavaron tres veces con tampón PBS [PBS 0.01 M, pH 7.4] durante 5 min. A continuación, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (m/v) en tampón PBS durante 15 min, seguido por tres lavados con tampón PBS. Se incubaron los cubres en las placas con tampón de bloqueo [PBS conteniendo Triton X-100 al 0.3% (v/v) y BSA al 1% (m/v)] durante 1 h y, posteriormente, con el anticuerpo primario diluido en tampón PBS conteniendo Triton X-100 al 0.3% (v/v) y BSA al 0.5% (m/v) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con tampón PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario no unido. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con el fluorocromo Alexa 488 ó 594 diluido en PBS conteniendo Triton X-100 al 0.3% (v/v) y BSA al 0.5% (m/v) durante 2 h a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se hicieron tres lavados con PBS y los cubreobjetos conteniendo las células inmunoteñidas se montaron sobre un portaobjetos utilizando PBS:Glicerol (1:1) como medio de montaje. En la Tabla 1 se presentan los anticuerpos primarios usados y la concentración final de uso.

Transfección	Anticuerpo 1º	[Ac 1º]	Anticuerpo 2º	[Ac 2º]	Casa Comercial
Dysbindin-GFP /Rab18-DsRed	Anti-Rab18 (rabbit)	1 / 500	Anti-rabbit Alexa 594 (goat)	1 / 500	Sigma
	Anti-Rab18 (rabbit) +	1 / 500	Alexa 488 anti-mouse (chicken)	1 / 500	Sigma
Pallidin-CMyc /Rab18-DsRed			+		
	Anti-CMyc (mouse)	1 / 750	Alexa 594 anti-rabbit (goat)	1 / 500	AbD Serotec

4.- Microscopía confocal

Las muestras fueron visualizadas en un microscopio confocal LSM 5 EXCITER (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Los parámetros fijados para el análisis de las placas fueron los siguientes: láser Argón (488 nm) para la recogida del espectro de emisión de GFP y Alexa488 y láser HeNe (543 nm) para la visualización de DsRed y Alexa 594. La adquisición de imágenes se realizó con un objetivo Plan-Apocromático 63X (1.40 a.n.) de inmersión en aceite. Para la adquisición de la señal del fluorocromo Alexa488 y de GFP, se adquirió la fluorescencia emitida entre 505-550 nm, mientras que en el caso del fluorocromo Alexa594, se recogió la emisión entre 610-700 nm y para el fluorocromo DsRed, se registró la emisión entre 560-615 nm. Dependiendo de la profundidad de las células, se adquirieron 10-20 planos por canal.

5.- Procesamiento y análisis de las imágenes

Después de la adquisición, las imágenes fueron sometidas a un proceso de deconvolución con el paquete de software Huygens Professional 2.4.4 (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Holanda). La colocación entre los distintos marcadores fue examinada por una inspección visual plano por plano y se consideró como tal cuando las señales fueron coincidentes en los mismos planos. Mediante el programa Bitplane Imaris 7.2.3 (Zürich, Suiza) se crearon los canales de colocación y se obtuvo el valor numérico correspondiente al índice de colocación de los diferentes marcadores (Coeficiente de Manders).

Los valores que se muestran en las figuras representan la media \pm SEM (error estándar de la

media) de los resultados obtenidos a partir de al menos 2 experimentos independientes realizados sobre cultivos celulares separados de la línea utilizada durante el transcurso del trabajo experimental (en el experimento de colocación de myc-pallidin/Rab18, $n = 24$ células estimuladas y no estimuladas; para el experimento de colocación de dysbindinII-GFP/Rab18, $n = 17$ células estimuladas y no estimuladas; en el experimento de colocación de Q67L-NPY, $n = 16$ células; y en el experimento de NPY-GFP, $n = 16$ células sometidas a condiciones normales y $n = 12$ células tratadas con Nocodazol). Los resultados obtenidos fueron comparados estadísticamente con el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

1. Colocalización del mutante activo de Rab18(Q67L) y el marcador de gránulos de secreción NPY

Para profundizar en el estudio de la asociación de Rab18 con los gránulos de secreción, llevamos a cabo el análisis de la localización intracelular del mutante constitutivamente activo de la GTPasa [Rab18(Q67L)] con el neuropéptido de secreción NPY mediante microscopía confocal. Para ello, las células PC12 fueron co-transfectadas con DsRed-Rab18(Q67L) y NPY-GFP.

Como se puede observar en la Figura 1, correspondiente a dos células representativas adquiridas durante el estudio (n = 16 células) la señal de DsRed-Rab18(Q67L) (rojo) se distribuyó en estructuras punteadas que abundan en una posición yuxtannuclear. Por otra parte, la señal emitida por NPY-GFP (verde), que corresponde a la población de gránulos de secreción que contienen el neuropéptido, formó estructuras punteadas acumuladas cerca de la superficie celular, así como en una región yuxtannuclear que podría corresponder a la zona más distal del aparato de Golgi (TGN) donde tiene lugar el empaquetamiento de proteínas de secreción en gránulos de secreción de nueva formación. Cabe destacar que el mayor número de estructuras vesiculares positivas para Rab18(Q67L) que colocalizan con NPY (amarillo) se encontraron en esta última región, lo que apoya la idea de que Rab18 se asocia a una población particular de gránulos de secreción que se encuentran en las etapas tempranas de la ruta de secreción regulada.

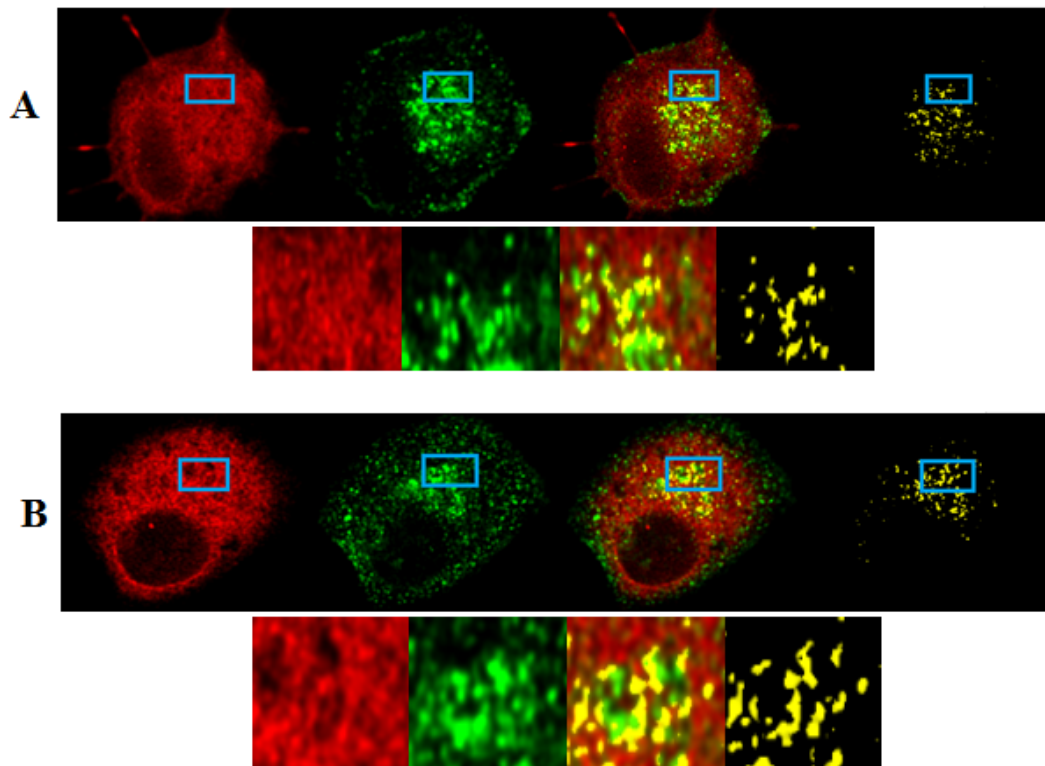


Figura 1: Imágenes representativas de microscopía confocal de células PC12 co-transfectadas con DsRed-Rab18(Q67L) y NPY-GFP. En la fila superior encontramos a Rab18(Q67L) en rojo y NPY en verde; en el tercer panel se muestran los canales combinados y el grado de colocalización de ambas señales (amarillo). En el último panel se muestra el canal correspondiente a las regiones donde ambas señales colocalizan (máscara de colocalización). En la fila inferior encontramos un aumento de la región de interés señalada en cada uno de los canales (recuadro azul) en la célula, donde se puede apreciar con mayor exactitud y detalle cada una de las señales, pudiendo apreciar el aumento de colocalización con respecto a las condiciones basales.

2. Colocalización de Rab18 endógena con dos subunidades del complejo BLOC1 (pallidin y dysbindin-II)

Para ello, realizamos estudios de la localización intracelular de Rab18 con respecto a la distribución de pallidin o dysbindin-II. Así, las células PC12 se transfectaron con los vectores de expresión c-myc-pallidin o GFP-Dysbindin-II y, transcurridas 24 h, se trataron o no con solución de KCl 53 mM durante 30 min. Finalmente, las células fueron fijadas e inmunoteñidas para Rab18.

2.1. Localización subcelular de posibles efectores de Rab18

En este sentido, realizamos estudios de localización intracelular de Rab18 y pallidin o dysbindin-II, para lo cual células PC12 se transfectaron con los vectores de expresión c-myc-pallidin, o DsRed-dysbindin-II (clonado por este laboratorio). Tras 24 h, las células se trataron o no con solución de KCl 53 mM y finalmente se inmunotiñeron para Rab18 y c-myc-pallidin.

En células transfectadas con el vector c-myc-pallidin, la inmunotinción se asoció a estructuras de tipo vesicular (Figura 2). En cuanto a la relación de esta proteína con Rab18, nuestros análisis de colocalización mostraron que, en estado basal, una cierta proporción de las vesículas Rab18-positivas muestran también inmunomarcaje para este componente del complejo BLOC1 (Figura 2A). El grado de coincidencia espacial entre ambos marcadores fue más evidente tras la estimulación de la ruta de secreción regulada (Figura 2B).

Numéricamente, el aumento de la colocalización entre las vesículas positivas para Rab18 y pallidin inducido por K^+ fue del 14,2% (n = 24 células no estimuladas y estimuladas; Figura 3).

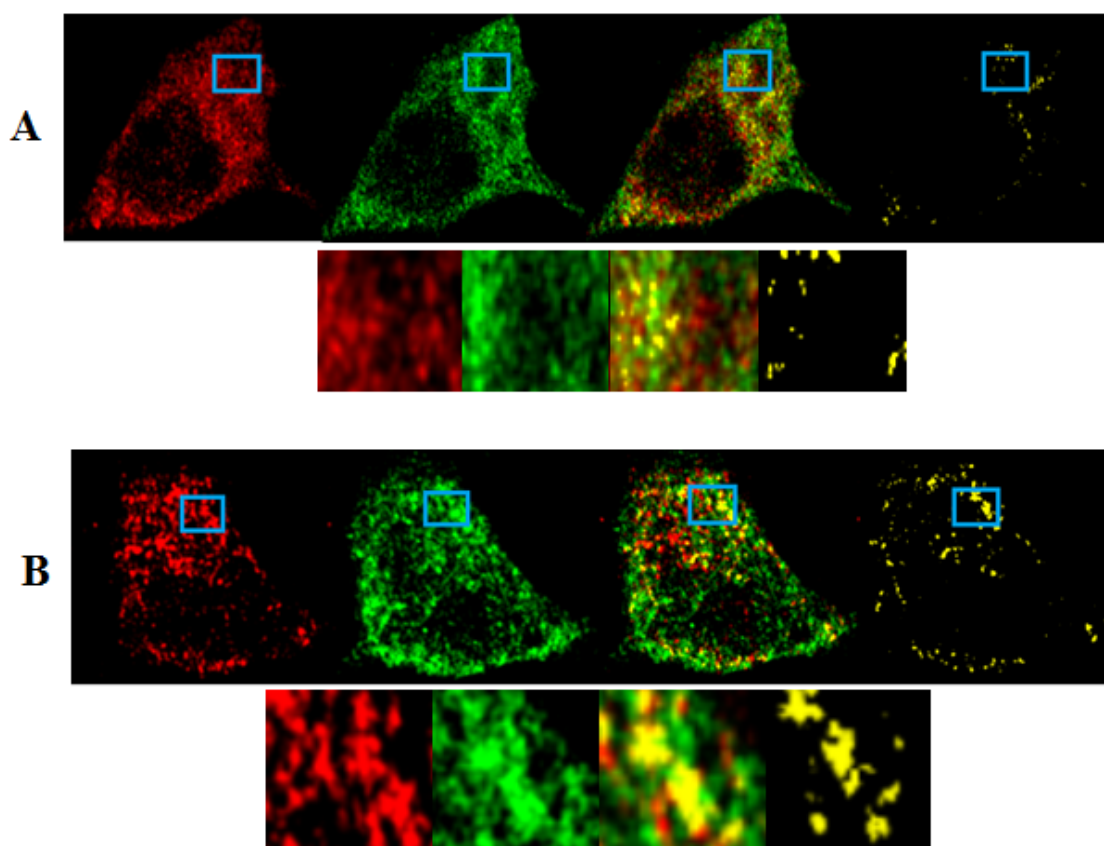


Figura 2: Imágenes representativas de microscopía confocal de células PC12 transfectadas con el vector c-myc-pallidin. En la imagen A, la célula se encuentra bajo condiciones basales; en la imagen B, la célula ha sido estimulada con KCL 53mM. En la fila inferior encontramos un aumento de la región de interés señalada en cada uno de los canales (recuadro azul) en la célula, donde se puede apreciar con mayor exactitud y detalle cada una de las señales, pudiendo apreciar el aumento de colocalización con respecto a las condiciones basales.

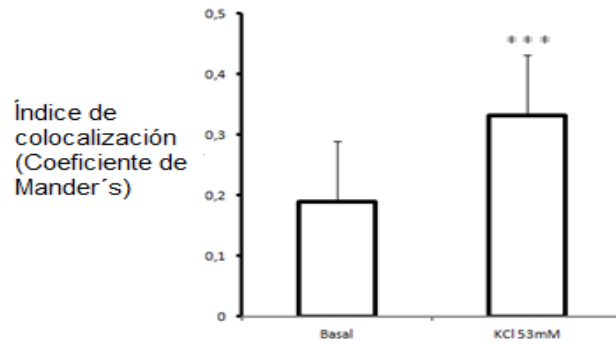


Figura 3: En el eje horizontal encontramos los valores correspondientes para cada una de las condiciones analizadas, mientras que en el eje vertical se hallan los valores de colocalización obtenidos, determinantes del grado de colocalización. Como nos muestra la gráfica, las células estimuladas con KCl 53 mM presentan un aumento significativo del coeficiente de colocalización, en comparación a las células expuestas a condiciones basales. El análisis estadístico mediante la realización del test t de Student, muestra que los datos son paramétricos y que la hipótesis que planteamos es verdadera. $P < 0,001$ vs. basal; $n = 24$ células.

Por otra parte, también analizamos la relación espacial entre los gránulos de secreción positivos para Rab18 y dysbindin-II. Para ello, transfectamos células PC12 con DsRed-dysbindin-II y posteriormente inmunoteñimos las células contra Rab18. Como se puede observar en las Figura 4, que muestra células representativas en condiciones basales (4A) y tras la estimulación de la ruta de secreción regulada (4B), la coincidencia espacial de ambas señales fluorescentes fue significativamente menor (18,5%; $n = 17$ células no estimuladas y estimuladas; Figura 5) en células expuestas a KCl que en células control, lo que sugiere que Rab18 podría interactuar con dysbindin-II previo a la activación de la GTPasa, para posteriormente disociarse de ésta tras la estimulación de la ruta de secreción.

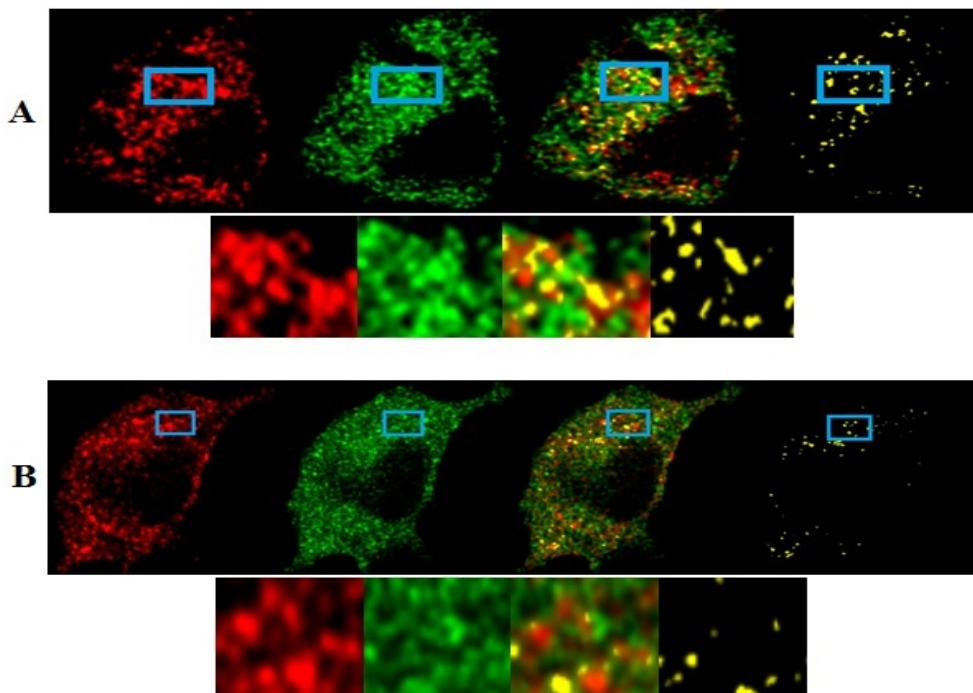


Figura 4: imágenes de microscopía confocal de células PC12 sometidas a condiciones basales (A) y estimuladas (B). Observamos Rab18 en rojo seguida de Dysbindin-II en color verde; en el tercer canal encontramos la señal de colocalización de ambas proteínas en color amarillo y, por último, la máscara de colocalización. En la fila inferior se representan los mismos canales en el mismo orden pero con una zona de interés representativa seleccionada aumentada (recuadro azul), que nos permite una visualización más detallada de cada señal.

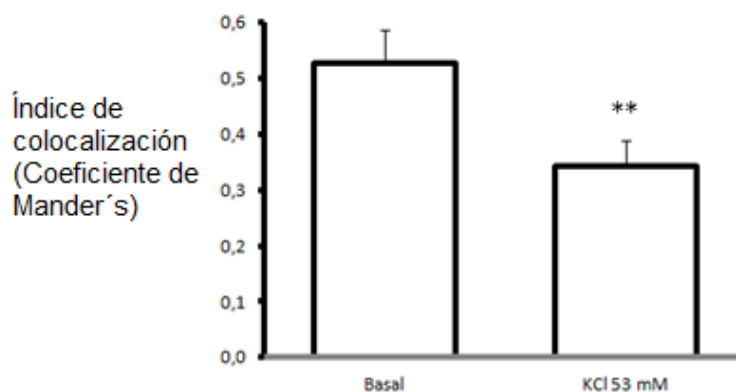


Figura 5: En el eje horizontal encontramos los valores correspondientes para cada una de las condiciones analizadas, mientras que en el eje vertical se hallan los valores de colocalización obtenidos, determinantes del grado de colocalización. Como nos muestra la gráfica, las células estimuladas con KCl 53mM presentan una disminución significativa del coeficiente de colocalización, en comparación a las células expuestas a condiciones basales. El análisis estadístico mediante la realización del test t de Student, muestra que los datos son paramétricos y que la hipótesis que planteamos es verdadera. $P < 0,05$ vs. basal. $n = 17$ células.

3. Análisis del papel de la red de microtúbulos en el reclutamiento de Rab18 hacia los gránulos de secreción

Para profundizar en la relación funcional que mantienen los gránulos Rab18-positivos con la red de microtúbulos, se investigó el efecto que tiene la desestabilización de los microtúbulos sobre la distribución intracelular del mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L) fusionado con GFP.

La Figura 6 muestra imágenes fluorescentes representativas de células que expresan GFP-Rab18(Q67L) en ausencia (A) o en presencia (B) del agente desestabilizador de microtúbulos nocodazol. Esta aproximación experimental reveló que la distribución intracelular punteada típica de Rab18(Q67L) en células intactas es alterada completamente tras la desestabilización de la red de microtúbulos. Concretamente, GFP-Rab18(Q67L) se distribuyó de manera difusa por todo el citosol en presencia de nocodazol. La cuantificación del número de gránulos positivos para GFP-Rab18(Q67L) por unidad de superficie celular evidenció que, mientras que la versión silvestre de Rab18 en células tratadas con K^+ o el mutante activo en células no tratadas se acumulaban en estructuras punteadas, el tratamiento con nocodazol indujo una disminución del 80% en el número

de gránulos positivos para la GTPasa [0.84 ± 0.09 vs. 0.14 ± 0.02 gránulos con Rab18(Q67L)/ μm^2 en ausencia y presencia de nocodazol, respectivamente] (Figura 6).

Estos datos indican que el reclutamiento de Rab18 a la superficie de los gránulos de secreción requiere la existencia de una red íntegra de microtúbulos. Sin embargo, cabe la posibilidad que el tratamiento con nocodazol afecte a la asociación de Rab18 a los gránulos indirectamente como consecuencia del bloqueo de su biogénesis. Para comprobar esto, evaluamos el número de gránulos de secreción conteniendo NPY-GFP en células sometidas o no al tratamiento con el agente despolimerizante de microtúbulos. En la Figura 7 se muestran imágenes de microscopía confocal de células control (Fig. 7A) y de células sometidas al tratamiento con nocodazol (Fig. 7B). En estas imágenes se puede observar que el tratamiento no afecta a la presencia de gránulos positivos para NPY-GFP, lo que se representa cuantitativamente en la Figura 8, que muestra el valor medio de gránulos de secreción/ μm^2 en células control y tratadas.

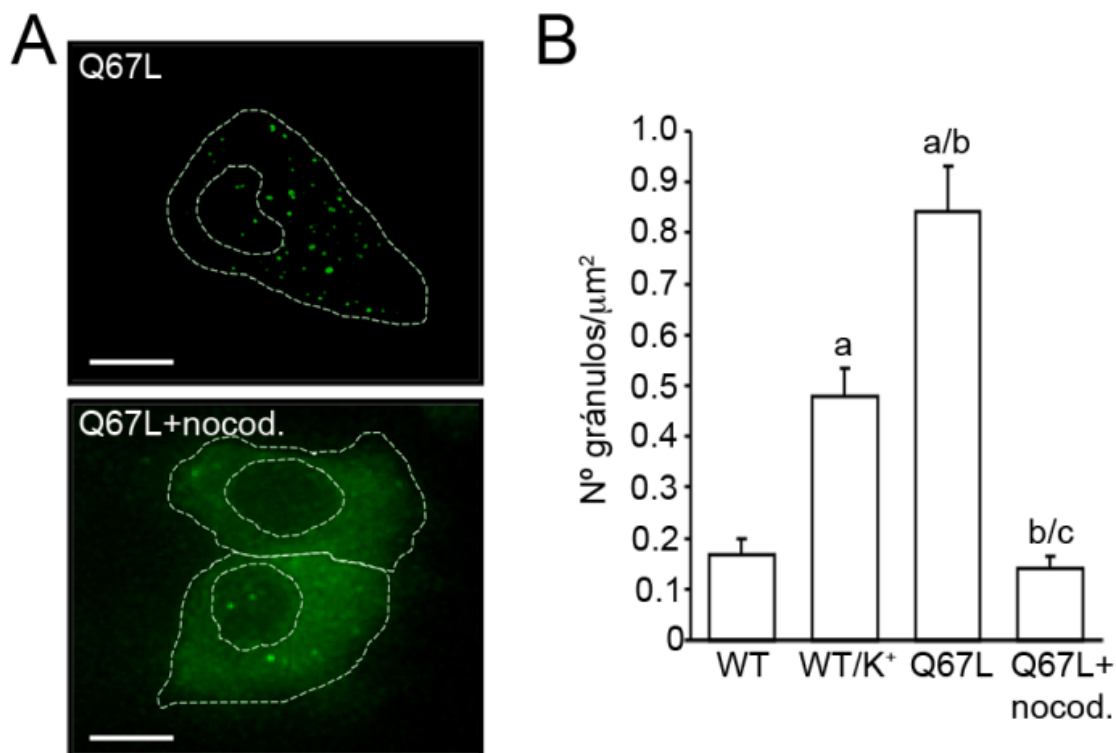


Figura 6: La despolimerización de la red de microtúbulos impide la asociación de Rab18 con los gránulos de secreción. Células transfectadas con GFP-Rab18(Q67L) fueron tratadas con nocodazol 10 μM durante 1 h y el número de gránulos positivos para Rab18 fue cuantificado con ImageJ. (A) Micrografías representativas de células que expresan GFP-Rab18(Q67L) en condiciones basales (panel superior) y tras el tratamiento con nocodazol (panel inferior). En ausencia de nocodazol, GFP-Rab18(Q67L) se distribuye mayoritariamente en estructuras punteadas. Tras la despolimerización de la red de microtúbulos, el mutante activo presenta una distribución difusa en el citosol. Barras de escala, 5 μm . (B) Cuantificación del número de gránulos positivos para Rab18 en células transfectadas con la forma silvestre de Rab18 (WT) o con Rab18(Q67L). Tal como se muestra en la gráfica, el número de gránulos positivos para Rab18, que aumentó tras la despolarización con K^+ de células transfectadas con Rab18WT o en células no estimuladas y transfectadas con el mutante activo, disminuyó considerablemente después del tratamiento con nocodazol. a, $P < 0.05$ vs. WT; b, $P < 0.05$ vs.

WT/K⁺; c, $P < 0.05$ vs. Q67L).

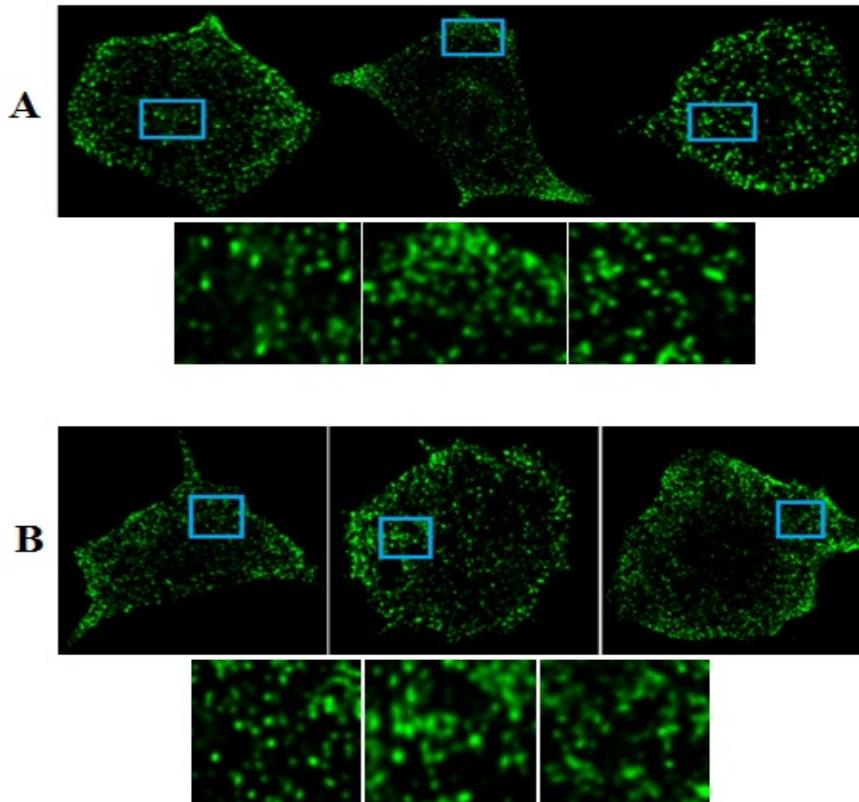


Figura 7: Imágenes representativas de microscopía confocal de células transfectadas con el plásmido NPY-GFP. En la imagen superior (A), encontramos células no sometidas a tratamiento con Nocodazol, mientras que en la imagen inferior (B), observamos células sometidas al tratamiento durante 1 h previa a la fijación. Ambas imágenes muestran regiones representativas y aumentadas de las células, donde podemos ver con mayor detalle a NPY en los gránulos de secreción.

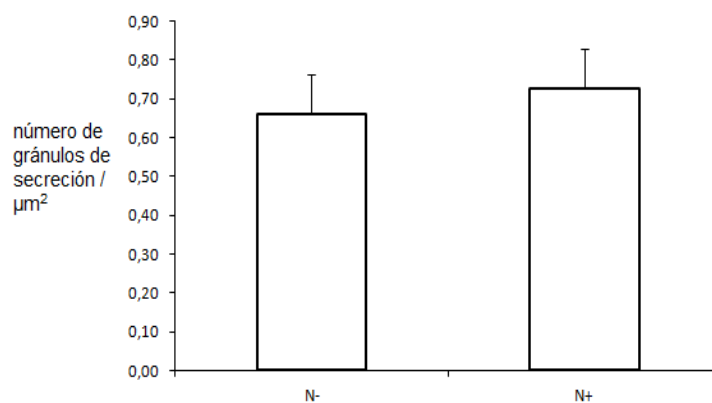


Figura 8: Gráfica representativa de los dos grupos de células sometidos a las diferentes condiciones. En el eje horizontal observamos las dos condiciones utilizadas para el desarrollo del experimento; en el eje vertical está representado el número de gránulos de secreción/μm². En el grupo control fueron analizadas 16 células, mientras que en el grupo tratado con nocodazol contabilizamos 12. $P < 0,001$ vs. control.

Observando la gráfica y analizando las diferentes imágenes obtenidas, podemos observar que el número de gránulos/unidad de superficie se mantiene constante tras el tratamiento con el agente despolimerizador. Con estos datos podemos concluir que el número de gránulos no se ve afectado por la despolimerización de los microtúbulos.

DISCUSIÓN

En trabajos previos, este laboratorio demostró que Rab18, en su forma activa, se asocia a una población particular de gránulos de secreción en células (neuro)endocrinas, lo que provoca una inhibición de su capacidad de movimiento anterógrado y, como consecuencia, una disminución de la tasa de secreción neta de dichas células en respuesta a estímulos extracelulares [48]. También se mostró que el compartimento secretor positivo para Rab18 es diferente al que se asocia Rab3A, otra Rab GTPasa que regula el proceso de exocitosis en sus últimas etapas: docking y fusión de gránulos de secreción con la membrana plasmática [51,53]. Estas observaciones, junto al análisis ultraestructural de la población de gránulos de secreción positivos para Rab18 que reveló que estos se encuentran a cierta distancia de la membrana plasmática, condujo a proponer que Rab18 actúa en etapas tempranas del proceso secretor [48,49]. De acuerdo con esta propuesta, en este estudio hemos mostrado que el mutante constitutivamente activo de Rab18 [Rab18(Q67L)] colocaliza con una población de gránulos positivos para NPY-GFP que se distribuyen alejados de la membrana plasmática en lo que puede corresponder a zonas cercanas a la red trans del aparato de Golgi (TGN).

Como se ha mencionado en la Introducción, durante las etapas tempranas de la ruta secretora regulada, los péptidos de secreción sufren una clasificación y empaquetado en gránulos que se forman a partir de membranas del TGN [modelo de *sorting-for-entry* [50,52]. En este escenario, los gránulos de secreción recién formados contendrían una carga homogénea compuesta exclusivamente por péptidos de secreción listos para ser dirigidos a la membrana plasmática y liberados en respuesta a estímulos extracelulares. Según este modelo de clasificación y transporte de proteínas de secreción, cabría preguntarse cuál podría ser el significado biológico de la retención de una población determinada de gránulos de secreción mediada por Rab18. Una posibilidad es que la célula necesite retener un determinado número de gránulos de nueva síntesis debido a que su contenido requiere un mayor procesamiento para que los péptidos de secreción adquieran actividad biológica antes de pasar a formar parte del pool de gránulos listos para ser liberados. De acuerdo con esto, muchas hormonas peptídicas se sintetizan inicialmente como precursores inactivos que son procesados fundamentalmente en los gránulos de secreción [54,55]. Es en estos orgánulos donde las prohormonas y las proteasas que las procesan interaccionan, generándose las formas bioactivas correspondientes que serán finalmente secretadas [13].

A principios de los años 90 se propuso un modelo alternativo de clasificación de proteínas en la ruta secretora (modelo de *sorting-by-retention*), según el cual los DCGs no se formarían de una manera activa a partir de la membrana del TGN, sino que se generarían a partir de proyecciones

túbulo-vesiculares del TGN que, eventualmente, se separarían de la red y formarían ISGs [56]. Así pues, todas las proteínas, independientemente de su destino final, entrarían en ISGs y, una vez allí, aquellas proteínas destinadas a ser liberadas por la vía constitutiva, a ser transportadas a otros orgánulos como lisosomas o endosomas, o devueltas al aparato de Golgi para su reciclaje serían extraídas mientras que las destinadas a ser liberadas por la vía de secreción regulada serían retenidas de manera selectiva en espera del estímulo apropiado que induzca su liberación [13].

Previamente se demostró que Rab18 se asocia a una subpoblación de gránulos de secreción en tres tipos celulares con ruta de secreción regulada, i.e., las células PC12, la línea corticotropa AtT20, y las células melanotropas hipofisarias, aunque no se obtuvieron pruebas experimentales sólidas que permitieran establecer la naturaleza exacta de dichos gránulos [52]. No obstante, ya entonces se sugirió que Rab18 actuaría en fases tempranas del tráfico de gránulos, en base a la observación de que los gránulos Rab18-positivos se localizaban a una distancia considerable en relación a la superficie celular, lo que se ha confirmado en este estudio. Así pues, existe la posibilidad de que los gránulos marcados con Rab18 pudieran corresponder a una subpoblación funcional particular. En concreto, el ensayo de doble híbrido de levadura permitió la identificación de varias proteínas relacionadas con el sistema de endosomas/lisosomas que podrían interactuar con Rab18, entre las cuales se encontraban ciertos componentes del complejo BLOC1 (pallidin y dysbindin-II).

En este trabajo, se ha mostrado mediante inmunocitoquímica y microscopía confocal que Rab18 se localiza en las mismas estructuras vesiculares que dysbindin-II en condiciones basales y en estructuras positivas para pallidin tras la estimulación de la ruta de secreción regulada, lo que, en principio, podría sugerir la existencia de una relación funcional entre orgánulos relacionados con el sistema endo-lisosomal y los gránulos de secreción mediada por Rab18. En este contexto, y según el modelo clasificación de proteínas de *sorting-by-retention*, los ISGs están relacionados con el sistema endo-lisosomal ya que transfieren parte de su contenido (i.e. enzimas lisosomales), mediante la gemación de vesículas recubiertas de clatrina, a orgánulos de dicho sistema [57]. Estas observaciones, junto con el demostrado papel de Rab18 en la regulación de la secreción en células neuroendocrinas, sugiere una posible implicación de Rab18, directa o indirecta, en la maduración del cargo contenido en los gránulos y secretado por estas células.

Los experimentos de colocalización de Rab18 y las proteínas del complejo BLOC1 identificadas por Y2H (pallidin y dysbindin-II) pueden ayudar a proponer un modelo de actuación de Rab18 en relación a los ISGs. BLOC1 es un complejo multiproteico compuesto por 8 subunidades, 5 de las cuales (pallidin, muted, cappuccino, dysbindin y BLOS3) se han asociado con

el síndrome de Hermansky-Pudlak, un desorden autosómico recesivo que afecta a la biogénesis de orgánulos relacionados con lisosomas y caracterizado por la aparición de albinismo de piel, ojos y pelo, sangrado continuado y fibrosis pulmonar [58]. Existen evidencias experimentales que demuestran una interacción directa de componentes del complejo BLOC1 con subunidades del complejo adaptador AP-3 [59], un componente de la maquinaria celular que controla la clasificación y transporte de proteínas específicas desde endosomas hacia lisosomas y a otros orgánulos especializados como los melanosomas [24] o vesículas sinápticas [60]. Estos complejos adaptadores son reclutados a sus membranas dianas gracias a la acción de proteínas Ras GTPasas de bajo peso molecular y fosfolípidos de inositol [1]. En el caso concreto de AP-3, el complejo es reclutado hacia la membrana de endosomas por la GTPasa Arf unida a GTP [61,62]. Curiosamente, se ha demostrado que la asociación del complejo BLOC1 a su membrana diana aumenta tras el tratamiento de las células con el análogo de GTP no hidrolizable GTP γ S, lo que sugiere que, al igual que sucede con AP-3, el reclutamiento de BLOC1 a membrana también depende de la actividad de una GTPasa [59]. Dada la interacción de Rab18 con varias subunidades del complejo BLOC1, cabría la posibilidad de que esta GTPasa actúe como punto de ensamblaje de BLOC1 en la membrana de ISGs. De acuerdo con esta idea, se ha propuesto que BLOC1 participa en distintas etapas de la ruta secretora y la fusión de membranas puesto que muchas de sus subunidades interactúan directa o indirectamente con moléculas clave que regulan estos procesos, tales como proteínas Rab [63], SNAREs [26,63,64], Sec1/Munc18-like [65] y subunidades de factores de tethering como el exocisto [66,67,68]. Así pues, teniendo en cuenta el conjunto de estos resultados, es razonable proponer que, tras su activación, Rab18 podría ayudar a reclutar al complejo BLOC1/AP-3 a la superficie de los ISGs para que se lleve a cabo la clasificación del cargo, la formación de vesículas con carga lisosomal y la transición de ISGs a MSGs que contengan una carga homogénea en productos de secreción regulada y, por tanto, listos para ser liberados en respuesta a estímulos extracelulares.

CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son:

- 1.- Rab18 se asocia a gránulos de secreción en las etapas tempranas de la ruta de secreción regulada en un proceso dependiente de microtúbulos.
- 2.- Existe una estrecha relación espacial entre Rab18 y factores reguladores de la biogénesis de lisosomas (pallidin y dysbindin-II), lo que sugiere que la GTPasa podría mediar la clasificación de enzimas lisosomales a partir de gránulos de secreción inmaduros.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bonifacino JS., Glick BS.; “The mechanisms of vesicle budding and fusion”. *Cell*. 2004, 116:153-166.
- 2.- Gerdes HH. “Membrane traffic in the secretory pathway”. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008, 2779-2780.
- 3.- Joshua J. Park and Y. Peng Loh. “How Peptide Hormone Vesicles Are Transported to the Secretion Site for Exocytosis”. *Molecular Endocrinology*. 2008, 22, 2583–2595.
- 4.- Brett TJ, Traub LM.; “Molecular structures of coat and coat-associated proteins: function follows form”. *Current Opinion Cell Biology*. 2006; 18:395-406.
- 5.- Takamori S, Holt M, Stenius K, Lemke EA, Grønborg M, Riedel D, Urlaub H, Schenck S, Brügger B, Ringler P, Müller SA, Rammner B, Gräter F, Hub JS, De Groot BL, Mieskes G, Moriyama Y, Klingauf J, Grubmüller H, Heuser J, Wieland F, Jahn R. “Molecular anatomy of a trafficking organelle”. *Cell*. 2006, 127:831-846.
- 6.- Lippincott-Schwartz J, Roberts TH, Hirschberg K. “Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells”. *Annual Review in Cell Developmental Biology*. 2000, 16:557-589.
- 7.- Arvan P, Castle D.; “Sorting and storage during secretory granule biogenesis : looking backward and looking forward”. *Biochemical Journal*. 1998, 332:593-610.
- 8.- Kelly RB.; “Pathways of protein secretion in eukaryotes”. *Science*. 1985, 230: 25-32.
- 9.- Kuliawat R, Arvan P.; “Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells”. *The Journal of Cell Biology*. 1994, 126:77-86.
- 10.- Tooze SA.; “Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells”. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1998, 1404:231-244.
- 11.- Arvan P, Castle D.; “Protein sorting and secretion granule formation in regulated secretory cells”. *Trends in Cell Biology*. 1992, 2:327-331.
- 12.- Joëlle Morvan, Sharon A. Tooze. “Discovery and progress in our understanding of the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells”. *Histochemical and Cell Biology*. 2008, 129:243–252.
- 13.- Taeyoon Kim, Marjorie C. Gondré-Lewis, Irina Arnaoutova and Y. Peng Loh. “Dense-Core Secretory Granule Biogenesis”. *Physiology*. 2006, 21:124-133.
- 14.- J. Paul Luzio, Paul R. Pryor & Nicholas A. Bright. “Lysosomes: fusion and function”. *Nature reviews; Molecular and Cell Biology*. 2007, 622-632.
- 15.- Diane McVey Ward Ph.D., Shelly L. Shiflett, Jerry Kaplan Ph.D. “Lysosome Biogenesis and Dynamics”. *Molecular Biology Intelligence Unit*. 2005, 111-126.

- 16.-** Paul Saftig and Judith Klumperman; “Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function”. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2009, 10:623-635.
- 17.-** J. Paul Luzio¹, Brian A. Rous, Nicholas A. Bright, Paul R. Pryor, Barbara M. Mullock and Robert C. Piper. “Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis”. *Journal of Cell Science*. 2000, 113:1515-1524.
- 18.-** J. Paul Luzio, Viviane Poupon, Margaret R. Lindsay, Barbara M. Mullock, Robert C. Piper and Paul R. Pryor. “Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes (review)”. *Molecular Membrane Biology*. 2003, 20:141-154.
- 19.-** Van Meel E, Klumperman J. “Imaging and imagination: understanding the endo-lysosomal system”. *Histochemical Cell Biology*. 2008, 129:253-266.
- 20.-** Ho Lee, Daniel Nemecek, Christina Schindler, William J. Smith, Rodolfo Ghirlando, Alasdair C. Steven, Juan S. Bonifacino and James H. Hurley Hyung. “Assembly and Architecture of Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex-1 (BLOC-1)”. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012, 287:5882-5890.
- 21.-** Andrew R. Cullinane, James A. Curry, Gretchen Golas, James Pan, Carmelo Carmona-Rivera, Richard A. Hess¹, James G. White, Marjan Huizing and William A. Gahl. “A BLOC-1 mutation screen reveals a novel BLOC1S3 mutation in Hermansky–Pudlak Syndrome type 8”. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012, 25:584–591.
- 22.-** Veronica T. Cheli, Richard W. Daniels, Ruth Godoy, Diego J. Hoyle, Vasundhara Kandachar, Julian A. Martinez Agosto, Stephen Pool, Aaron DiAntonio, Vett K. Lloyd, Henry C. Chang, David E. Krantz and Esteban C. Dell’Angelica. “Genetic modifiers of abnormal organelle biogenesis in a *Drosophila* model of BLOC-1 deficiency”. *Human Molecular Genetics*. 2010, 5:861–878.
- 23.-** Wei ML. “Hermansky-Pudlak syndrome: a disease of protein trafficking and organelle function”. *Pigment Cell Research*. 2006, 19:19-42.
- 24.-** Ariana P. Mullin, Avanti Gokhale, Jennifer Larimore, Victor Faundez. “Cell Biology of the BLOC-1 Complex Subunit Dysbindin, a Schizophrenia Susceptibility Gene”. *Molecular Neurobiology*. 2011, 44:53–64.
- 25.-** Cristina A Ghiani and Esteban C Dell’Angelica. “Dysbindin-containing complexes and their proposed functions in brain: from zero to (too) many in a decade”. *ASN Neurology*. 2011.
- 26.-** Setsuko Taneichi-Kuroda a, Shinichiro Taya a,b, Takao Hikita a,b, Yasutaka Fujino a,b, Kozo Kaibuchi. “Direct interaction of Dysbindin with the AP-3 complex via its μ subunit”. *Neurochemistry International*. 2009, 54:431–438.
- 27.-** Avanti Gokhale, Jennifer Larimore, Erica Werner, Lomon So, Andres Moreno-De-Luca, Christa Lese-Martin, Vladimir V. Lupashin, Yoland Smith and Victor Faundez. “Quantitative Proteomic and Genetic Analyses of the Schizophrenia Susceptibility Factor Dysbindin Identify Novel Roles of the Biogenesis of Lysosome-Related Organelles Complex 1”. *The Journal of Neuroscience*. 2012, 32:3697–3711.
- 28.-** Kengo Moriyama and Juan S. Bonifacino. “Pallidin is a Component of a Multi-Protein Complex Involved in the Biogenesis of Lysosome related Organelles”. *Traffic*. 2002, 3:666-677.

- 29.-** Juan M. Falcón-Pérez, Marta Starcevic, Rashi Gautam and Esteban C. Dell'Angelica. "BLOC-1, a Novel Complex Containing the Pallidin and Muted Proteins Involved in the Biogenesis of Melanosomes and Platelet-dense Granules". *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277: 28191-28199.
- 30.-** Larimore J, Tornieri K, Ryder PV, Gokhale A, Zlatic SA, Craige B, Lee JD, Talbot K, Pare JF, Smith Y, Faundez V. "The schizophrenia susceptibility factor dysbindin and its associated complex sort cargoes from cell bodies to the synapse". *Molecular Biology of the Cell*. 2011, 24:4854-4467.
- 31.-** Angers CG, Merz AJ. "New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting". *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2001, 22:18-26.
- 32.-** Hammer JA, Wu XS. "Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins". *Current Opinion in Cell Biology*. 2002, 14:69-75.
- 33.-** Echard A, Jollivet F, Martinez O, Lacapère JJ, Rousselet A, Janoueix-Lerosey I, Goud B. "Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6". *Science*. 1998, 279:580-585.
- 34.-** Wickner W, Schekman R. "Membrane fusion". *Nature Structure and Molecular Biology*. 2008, 15:658-664.
- 35.-** Pfeffer S. "A model for Rab GTPase localization". *Biochemical Society Transactions*. 2005, 33:627-630.
- 36.-** Seabra MC, Wasmeier C. "Controlling the location and activation of Rab GTPases". *Current Opinion in Cell Biology*. 2004, 16:451-457.
- 37.-** Pfeffer SR. "Structural clues to Rab GTPase functional diversity". *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280:15485-15488.
- 38.-** Zerial M, McBride H. "Rab proteins as membrane organizers". *Nature reviews. Molecular Cell Biology*. 2001, 2:107-117.
- 39.-** Sönnichsen B, De Renzis S, Nielsen E, Rietdorf J, Zerial M. "Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11". *Journal of Cell Biology*. 2000, 149:901-914.
- 40.-** Stenmark H. "Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic". *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2009, 10:513-525.
- 41.-** Vetter IR, Wittinghofer A. "The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions". *Science*. 2001, 294:1299-1304.
- 42.-** Dumas JJ, Zhu Z, Connolly JL, Lambright DG. "Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins". *Structure*. 1999, 7:413-423.
- 43.-** Barr F, Lambright DG. "Rab GEFs and GAPs". *Current Opinion in Cell Biology*. 2010, 22:461-470.
- 44.-** Pfeffer S, Aivazian D. "Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments". *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 2004, 5:886-896.

- 45.-** Yu H, Leaf DS, Moore HP. “Gene cloning and characterization of a GTP-binding Rab protein from mouse pituitary AtT-20 cells”. *Gene*. 1993, 132:273-278.
- 46.-** Leung KF, Baron R, Ali BR, Magee AI, Seabra MC. “Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation”. *Journal of Biological Chemistry*. 2007, 282:1487-1497.
- 47.-** Pulido MR, Diaz-Ruiz A, Jiménez-Gómez Y, Garcia-Navarro S, Gracia-Navarro F, Tinahones F, López-Miranda J, Frühbeck G, Vázquez-Martínez R, Malagón MM. “Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity”. *PLoS One*. 2011, 6:22931.
- 48.-** Vazquez-Martinez R, Cruz-Garcia D, Duran-Prado M, Peinado JR, Castaño JP, Malagon MM. “Rab18 inhibits secretory activity in neuroendocrine cells by interacting with secretory granules”. *Traffic*. 2007, 8:867-882.
- 49.-** Vazquez-Martinez R, Martinez-Fuentes AJ, Pulido MR, Jimenez-Reina L, Quintero A, Leal-Cerro A, Soto A, Webb SM, Sucunza N, Bartumeus F, Benito-Lopez P, Galvez-Moreno MA, Castaño JP, Malagon MM. “Rab18 is reduced in pituitary tumors causing acromegaly and its overexpression reverts growth hormone hypersecretion”. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008, 93:2269-76.
- 50.-** Chung KN, Walter P, Aponte GW, Moore HP. “Molecular sorting in the secretory pathway”. *Science*. 1989, 243:192-197.
- 51.-** Martelli AM, Baldini G, Tabellini G, Koticha D, Bareggi R, Baldini G. “Rab3A and Rab3D control the total granule number and the fraction of granules docked at the plasma membrane in PC12 cells”. *Traffic*. 2000, 12:976-986.
- 52.-** Cool DR, Normant E, Shen F, Chen HC, Pannell L, Zhang Y, Loh YP. “Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(fat) mice”. *Cell*. 1997, 88:73-83.
- 53.-** Schlüter OM, Khvotchev M, Jahn R, Südhof TC. “Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion”. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277:40919-40929.
- 54.-** Seidah NG. “The proprotein convertases, 20 years later”. *Methods of Molecular Biology*. 2011, 768:23-57.
- 55.-** Seidah NG, Prat A. “Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu”. *Essays in Biochemistry*. 2002, 38:79-94.
- 56.-** Rambourg A, Clermont Y, Chrétien M, Olivier L. “Formation of secretory granules in the Golgi apparatus of prolactin cells in the rat pituitary gland: a stereoscopic study”. *Anatomical Record*. 1992, 232:169-179.

- 57.-** Braulke T, Bonifacino JS. "Sorting of lysosomal proteins". *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 1793:605-614.
- 58.-** Bonifacino JS. "Insights into the biogenesis of lysosome-related organelles from the study of the Hermansky-Pudlak syndrome". *Annals of New York Academy Sciences*. 2004, 1038:103-114.
- 59.-** Di Pietro SM, Falcón-Pérez JM, Tenza D, Setty SR, Marks MS, Raposo G, Dell'Angelica EC. "BLOC-1 interacts with BLOC-2 and the AP-3 complex to facilitate protein trafficking on endosomes". *Molecular Biology of the Cell*. 2006, 17:4027-4038.
- 60.-** Newell-Litwa K, Salazar G, Smith Y, Faundez V. "Roles of BLOC-1 and adaptor protein-3 complexes in cargo sorting to synaptic vesicles". *Molecular Biology of the Cell*. 2009, 5:1441-1453.
- 61.-** Faúndez V, Horng JT, Kelly RB. "A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes". *Cell*. 1998, 93:423-432.
- 62.-** Ooi CE, Dell'Angelica EC, Bonifacino JS. "ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes". *Journal Cell of Biology*. 1998, 142:391-402.
- 63.-** Cheli VT, Dell'Angelica EC. "Early origin of genes encoding subunits of biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, -2 and -3". *Traffic*. 2010, 11:579-586.
- 64.-** Lu Q, Longo FM, Zhou H, Massa SM, Chen YH. "Signaling through Rho GTPase pathway as viable drug target". *Current Medicinal Chemistry*. 2009, 16:1355-1365.
- 65.-** Hikita T, Taya S, Fujino Y, Taneichi-Kuroda S, Ohta K, Tsuboi D, Shinoda T, Kuroda K, Funahashi Y, Uraguchi-Asaki J, Hashimoto R, Kaibuchi K. "Proteomic analysis reveals novel binding partners of dysbindin, a schizophrenia-related protein". *Journal of Neurochemistry*. 2009, 110:1567-1574.
- 66.-** Bao Y, Lopez JA, James DE, Hunziker W. "Snapin interacts with the Exo70 subunit of the exocyst and modulates GLUT4 trafficking". *Journal of biological chemistry*. 2008, 283:324-331.
- 67.-** Mead CL, Kuzyk MA, Moradian A, Wilson GM, Holt RA, Morin GB. "Cytosolic protein interactions of the schizophrenia susceptibility gene dysbindin". *Journal of Neurochemistry*. 2010, 113:1491-1503.
- 68.-** Rodriguez-Fernandez IA, Dell'Angelica EC. "A data-mining approach to rank candidate

protein-binding partners-The case of biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 (BLOC-1)". *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2009, 32:190-203.

AGRADECIMIENTOS

Tendría que agradecer a muchas personas el esfuerzo y el apoyo que me han brindado a lo largo de este año .

Empezaré por mi familia, ya que sin ellos no podría haber concluido mis estudios de máster, así como la Licenciatura: a mi madre, mi padre y mi hermano, porque a pesar de los problemas, siempre han estado ahí y me han regalado una sonrisa cuando lo he necesitado.

A mis amigas y amigos de Puertollano. La vida es más fácil cuando tienes a gente como ellos cerca, porque han escuchado una y otra vez todo lo que he hecho este año tanto en las clases de máster como en el laboratorio y, aún sin saber de qué les estaba hablando, se han interesado siempre y me ha dado sus mejores consejos. A mis amigas de Córdoba, porque gracias a ellas este año ha sido mucho más fácil y, como todos los anteriores, han contribuido para hacerlo de los mejores de mi vida.

A todo el Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba, en especial a mis jefes, los Doctores María del Mar Malagón y Rafael Vázquez. Porque gracias a ellos he podido crecer como persona y científica, porque cada día he aprendido algo nuevo y, sobre todo, por brindarme la oportunidad de haber podido trabajar y compartir todos sus conocimientos conmigo.

A mi abuelo, porque a pesar de que te fuiste hace poco, me has dado fuerzas para poder concluir esta etapa de mi vida.

Mis más sinceras gracias a todas las personas que me han acompañado este año y han contribuido a hacer uno de mis sueños realidad. Gracias de todo corazón.