

# TESIS DOCTORAL

## VÍA SECRETORIA DE PROTEÍNAS: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD REGULADORA DE LA GTPasa Rab1b

Pablo Miguel Monetta

Directora de Tesis: Dra. Cecilia Inés Álvarez



Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

(CIBICI-CONICET)

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

### Comisión de Tesis

**Dra. Cecilia Inés Alvarez (Directora)**

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

**Dr. Hugo Maccioni**

CIQUIBIC-CONICET. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencia Químicas.  
Universidad Nacional de Córdoba.

**Dra. Graciela Panzetta-Dutari**

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

**Dra. María Isabel Colombo**

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

### Evaluador Externo

**Dra. María Teresa Damiani**

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

*A Lili y Alfredo, mis viejos*

## **Agradecimientos**

*Son muchas, muchísimas las personas que contribuyeron, profesional o personalmente, al desarrollo del presente trabajo. Sin su ayuda me hubiera resultado imposible llegar a esta instancia. Es por eso que quisiera aprovechar este espacio para darles las gracias.*

*En primer lugar quiero agradecer a la **Dra. Cecilia Alvarez**, quien recién llegada de su estadía posdoctoral en Estados Unidos, me permitió ingresar a su grupo de trabajo para encarar la difícil tarea de iniciar un grupo de investigación en plena crisis económica. Cecilia, además de brindarme los medios necesarios para el desarrollo del plan de trabajo propuesto y de estar siempre disponible para cualquier duda que surgiera, me enseñó a trabajar en un laboratorio, a comprometerme con mi trabajo, a utilizar siempre el criterio para resolver inconvenientes y a confiar en mis capacidades. Todos estos aspectos han sido importantes para el desarrollo de mi tesis, sin embargo el punto principal que quisiera destacar de Cecilia, y por el cual le estoy profundamente agradecido, es por su cualidad humana, que facilitó mucho la convivencia en el grupo y permitió que estos seis años compartidos fueran una muy buena experiencia vivida.*

*Quiero agradecer a la comisión de tesis, **Dr. Hugo Maccioni, Dra. Graciela Panzetta-Dutari y Dra. María Isabel Colombo** por haber participado activamente durante las reuniones anuales realizadas y por haber leído y corregido el manuscrito de la tesis. Especialmente quiero agradecer a Marisa por haber hecho el esfuerzo de viajar desde Mendoza para cada una de las reuniones de tesis.*

*Al **Dr. Carlos Mas**, por haberme ayudado en la adquisición de imágenes in vivo.*

*A la **Dra. María Antonieta De Matteis** por haberme permitido realizar una pasantía por su laboratorio.*

*Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)** por el apoyo que brinda a la ciencia argentina y por los cinco años de beca que me otorgó.*

*No se si este es el lugar para hacerlo, pero quiero expresar mi gratitud hacia el sistema educativo argentino, que mas allá de sus grandes falencias brinda la posibilidad de acceder a una **educación** digna de manera **libre, pública, gratuita y laica**. Ennoblecendo el librepensamiento y la igualdad de oportunidades para todos.*

*A todos los miembros del **CIBICI/Departamento de Bioquímica Clínica**, por hacer de este espacio un ambiente donde conviven la rigurosidad científica y la camaradería.*

*Al **laboratorio 119-120**, por haber sido mi segundo hogar durante estos años. Por suerte me he llevado muy bien con todas las personas que están o han pasado por ahí.*

*Quisiera agradecer especialmente a quienes iniciaron el grupo hace ya varios años, los **Doctores Luis Patrino y Alfredo Flury**, por ser ejemplos de pasión y dedicación al trabajo, y porque siempre tienen una buena historia para contar.*

*A **Graciela Panzetta** y **Nicolás Koritschner**, quienes con sus materias “Bioquímica Molecular Analítica” y “Patología Molecular” me motivaron para tomar la decisión de hacer investigación.*

A **Susana Genti**, una de las personas más divertidas del laboratorio. Por su sentido del humor y por sus exquisitas tartas de ricota.

A **José Bocco**, compartí con él dos años en el consejo departamental y fue un ejemplo de criterio y sentido común a la hora de tomar decisiones.

A **José Echenique, el Pepe**. Por las charlas de las mañana, porque siempre tiene un chiste bajo la manga, por su ayuda con mis nuevos proyectos.

Quiero agradecer a los **becarios** en general, la esencia del laboratorio. Sin becarios sería muy difícil trabajar. En el laboratorio 119-120 somos una especie de comunidad. Siempre hay alguien disponible para darte una mano con un experimento; para explicarte cómo funciona un aparato; para mostrarte cómo tenés que llenar los papeles de Conicet; para darte el acta de su última reunión de tesis así le cambiás el nombre, la fecha y listo; etc, etc. Siempre hay alguien para escucharte hablar de un problema personal, del jefe o de lo que sea que necesites hablar.

En particular agradezco:

Al **Fer López Díaz** y **José Pruneda**, fueron ellos los que después de un par de semanas de soledad en el laboratorio se me acercaron y pronunciaron la frase “che titán, querés jugar al futbol?”. Ellos no lo saben, pero esa frase me ayudó a integrarme y a que todo fuera más fácil.

Al **Rodri**, el pájaro, un tipo simple, un grande. Un amigo dentro y fuera del laboratorio. Por innumerables charlas, asados, juntadas, partidos de futbol y viajes compartidos. Realmente extrañé mucho su salida del laboratorio.

A la **Sofi**. Una mina especial. Por haber desparramado y contagiado alegría y buen humor mientras estuvo en el laboratorio. Por demostrar que se puede trabajar y ser alegre al mismo tiempo.

Al **Alex**, el becario ideal. Un tipo apasionado por su trabajo y a la vez compañero y solidario al máximo. Le estoy muy agradecido por haberme dado importantes consejos en épocas difíciles que me tocó vivir.

Al **Flaco Ricardo**, el eterno goleador. Por los momentos compartidos en aquel inolvidable viaje a Brasil. Por las charlas de fútbol de los lunes a la mañana. Por los partidos de los martes, por la creación del campeonato, por vestir la camiseta del Ala Sur y, por supuesto, por su inexplicable capacidad para hacerle goles al Ala Norte.

A los viejos integrantes del grupo Rab, **Ile Slavin** y el gran **Nahuel Romero**. Compartimos más de cuatro años de trabajo, charlas y mates, y construimos una muy buena amistad. **Nahuel**, es un tipo bárbaro. Dueño de una tranquilidad envidiable y de un sentido del humor excelente. La **Ile**, mi compañera de mesada. Una mina genial. Sensible, conversadora y muy divertida. Fue un verdadero placer tenerlos de compañeros.

A los nuevos integrantes del grupo Rab, **Ale** y **Hernán**, por renovar el aire del grupo y por continuar con la tarea que comenzamos.

A los muchachos **Diego, Paulo, Germán, el Mauri**, y las chicas **Lucy, Anita, Vivi, Jesica, Sole, Andrea Georgina, Vero, Paula** y **Claudia**, por los mates, las charlas, los almuerzos, las hamburgueseadas, los asados, los congresos, y todos los momentos compartidos. Por hacer del laboratorio 119-120 un buen lugar para trabajar.

También quisiera agradecer a los integrantes de los otros laboratorios del departamento. Especialmente a **Juan Pablo Mackern, Gerardo Gatti, Antonio Carrera, Sol Renna, Vico Andreani, Magda Canali, Andrea Pellegrini, Eva Acosta, Seba Susperreguy, Ivan Mascanfroni, Juan Nicola, Cristian Falcón, Pepe Baronetti, Nico Nuñez, Danilo Ceschin, Sr. Leandro Cáceres, Pablo Barcelona, Dani Arroyo, Javi Soria, Caro Knubel, Carito Amezcua, Laurita Dulgerian, Silvi Aguirre, Ale Saragusti, Javier Jaldin, Turco Asís, Pablo Roqué, Gustavo Bonacci, Gustavo Chiabrando, Ana Cabanillas, Pablito Manavella** y **Gonza Roqueiro**.

A mis amigos **Rafa Fernández, Marcelo Calderón, Abdo Mejedin, Javier Lusso, Damián Ginnóbili, Natacha Zlockowski, Seiho Asato, Jordan Leiva, Jeremías Falivene, Fernando Venezuela** y **Dieguito Gagliari**. Quienes han sido mi gran familia cordobesa durante los doce años que llevo aquí.

A **Laura, mi hermana**, mi amiga. Por su constante apoyo. Por su cariño, por mantener viva la relación a pesar de la distancia. Por honrar y recordarme constantemente el valor de la familia.

A **Lili y Alfredo, mis viejos**, quienes me inculcaron valores elementales que me permiten caminar tranquilo por la vida. Porque siempre me apoyaron en todas mis decisiones, me brindaron la posibilidad de estudiar una carrera universitaria y me impulsaron a vivir una hermosa experiencia en Córdoba. Especialmente le agradezco a **mi viejo**, por contagiarme su pasión por el conocimiento y la ciencia. Por ser el “palenque donde ir a rascarse”, por haber estado a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida. A **mi vieja**, por haberme enseñado que vale la pena exprimir y disfrutar la vida, que todo tiene un lado positivo, que uno no es nadie si no se rodea de gente que lo quiere. Lamentablemente hace unos años nos tuvo que abandonar, se le acabó la vida de tanto vivirla. Igualmente, sé que estaría muy feliz al ver lo que he logrado.

Finalmente quiero agradecer a **Carla**, mi esposa, la mujer que amo. Por los seis años compartidos y los setenta por compartir. Por su apoyo constante, por sus palabras, por sus silencios, porque es la persona que mejor me entiende. Porque a su lado me siento mas fuerte, mas seguro y me permito soñar con lo que vendrá.

---

**INDICE**

<b>Abreviaturas</b>	1
<b>Resumen</b>	3
<b>Abstract</b>	4
<b>Introducción</b>	5
<b>Vía secretoria de proteínas</b>	7
Translocación al Retículo Endoplásmico y Control de calidad	7
Transporte entre Retículo Endoplásmico y complejo de Golgi	8
Transporte intra-Golgi	9
Transporte post-Golgi	10
<b>Factores que regulan el transporte de proteínas en la vía secretoria</b>	10
Proteínas de cubierta	11
Proteínas tethering o de enlace	16
Factores generales de fusión de membranas	17
Proteínas G con actividad GTPasa	18
<b>Rab GTPasas</b>	20
Aspectos Generales	20
Conservación evolutiva de su función	23
Modificaciones post-traduccionales	23
Mecanismo general de acción	24
Estructura de las proteínas Rab. Bioquímica de mutaciones puntuales	26
Patologías humanas que involucran Rab GTPasas	27
<b>Rab1, estado actual del conocimiento</b>	29

---

<b>Objetivos</b>	31
<b>Resultados</b>	32
<b>Capítulo 1</b>	33
<b><i>1. Caracterización del comportamiento dinámico del ciclo de Rab1</i></b>	33
1.1. Dinámica de Rab1 asociada a las estructuras periféricas	36
1.2. Dinámica de asociación de Rab1 a las membranas del complejo de Golgi	38
<b>Capítulo 2</b>	41
<b><i>2. Análisis de la función de Rab1 a nivel de los sitios de salida del retículo endoplásmico</i></b>	42
2.1. Rab1b modula la asociación de COPI a los sitios de salida del retículo endoplásmico	42
2.2. Rab1b modula la dinámica de asociación/disociación de Arf1 a las membranas del Golgi	44
2.3. Rab1b en su forma activa interacciona directamente con GBF1	47
2.4. Funcionalidad del dominio N-terminal de GBF1	49
2.5. Rab1b es necesaria para la asociación de GBF1 a las membranas	51
<b>Capítulo 3</b>	55
<b><i>3. Evaluación de la relación entre la función de Rab1b y la estructura del complejo de Golgi</i></b>	56
3.1. Análisis estructural del complejo de Golgi en el contexto de inactivación de Rab1b	57
3.1.1. Requerimiento de Rab1b para el mantenimiento de la estructura del Golgi	62
3.1.2. Análisis de transporte en células con expresión de Rab1b silenciada	64
3.2. Análisis estructural del complejo de Golgi en el contexto de activación de Rab1b	67
3.2.1. Efecto de la expresión de Rab1wt en la estructura del Golgi	67
3.2.2. Efecto de la expresión de Rab1bQ67L en la estructura del Golgi	69
3.2.3. Análisis de transporte en células con expresión de Rab1bwt y Rab1bQ67L	72
<b>Discusión</b>	75
GBF1, una nueva proteína efectora de Rab1b	76
Rab1b y reclutamiento de COPI	77
Rab1b y el transporte RE-Golgi	78



---

Rab1b y el transporte intra-Golgi	78
Rab1b y el transporte de VSV-G	79
Comportamiento dinámico de Rab1b	80
Rab1b y la estructura del Golgi	81
Conclusión-Mecanismo de acción de Rab1b	84
<b>Materiales y Métodos</b>	85
Construcciones de vectores plasmídicos	85
Anticuerpos utilizados	85
Líneas celulares humanas	86
Transfección de líneas celulares	86
Células bacterianas	86
Preparación de bacterias competentes	87
Transformación de células competentes	87
Inducción de proteínas de fusión unidas a GST	87
Purificación de proteínas de fusión unidas a GST	88
Preparación Rab1b recombinante	88
Preparación de citosol de hígado de rata	89
Ensayos de interacción de proteínas (Pull Down)	89
Ensayos de inmuno-fluorescencia (IF)	89
Ensayos de microscopía <i>in vivo</i>	90
Preparación de extractos celulares	91
Determinación de la concentración de proteínas. Método de Bradford	91
Separación de proteínas por peso molecular en geles de Acrilamida/SDS (PAA-SDS).	92
Tinción con Azul brillante de Coomassie	92
Identificación de proteínas por Western Blot	93
Silenciamiento de la expresión de genes por ARN de interferencia	93
Ensayo funcional de transporte de VSVG	94
Fraccionamiento sub-celular	94
Ensayos de Microscopía electrónica	95
Soluciones utilizadas	97
<b>Bibliografía consultada</b>	99

**Lista de Abreviaturas Utilizadas**

ADN	<u>Á</u> cido <u>d</u> esoxirribonucleico
Arf	<u>A</u> DP- <u>r</u> ibosylation <u>f</u> actor
ARN	<u>Á</u> cido <u>r</u> ibonucleico
ARNc	<u>A</u> RN <u>c</u> ortos
ARNi	<u>A</u> RN de <u>i</u> nterferencia
BFA	<u>B</u> refeldina <u>A</u>
CI	<u>C</u> ompartimiento <u>i</u> ntermedio
CLEM	<u>C</u> orrelative <u>l</u> ight <u>e</u> lectron <u>m</u> icroscopy
COPI	<u>C</u> oat <u>p</u> rotein <u>I</u>
COPII	<u>C</u> oat <u>p</u> rotein <u>II</u>
ERES	<u>E</u> R <u>e</u> xit <u>s</u> ites
ERGIC	<u>E</u> R- <u>G</u> olgi <u>i</u> ntermédiate <u>c</u> ompartment
FRAP	<u>F</u> luorescence <u>r</u> ecovery <u>a</u> fter <u>p</u> hotobleaching
GalT	<u>G</u> alactosyl <u>t</u> ransferase <u>II</u>
GAP	<u>G</u> TPase <u>a</u> ctivating <u>p</u> rotein
GBF1	<u>G</u> olgi-specific <u>B</u> FA resistant <u>f</u> actor <u>1</u>
GDF	<u>G</u> DI <u>d</u> issociation <u>f</u> actor
GDI	<u>G</u> DP <u>d</u> issociation <u>i</u> nhibitor
GDP	<u>G</u> uanosin <u>d</u> iphosphate
GEF	<u>G</u> uanine-nucleotide <u>e</u> xchange <u>f</u> actor
GFP	<u>G</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
GGT II	Geranyl- <u>G</u> eranyl <u>t</u> ransferasa <u>II</u>
GM130	<u>G</u> olgi <u>m</u> atrix protein <u>130</u>
GST	<u>G</u> lutation- <u>s</u> - <u>T</u> ransferasa
GTP	<u>G</u> uanosine <u>t</u> riphosphate
IF	<u>I</u> nmuno- <u>f</u> luorescencia
ME	<u>M</u> icroscopía <u>e</u> lectrónica
WB	<u>W</u> estern <u>b</u> lot
Rab	<u>R</u> as-like in rat <u>b</u> rain
RE	<u>R</u> etículo <u>E</u> ndoplásmico

REP	Rab <u>e</u> scort <u>p</u> rotein
T <sub>1/2</sub>	Tiempo de vida media
TGN	<u>T</u> rans <u>G</u> olgi <u>N</u> etwork
VTC	<u>V</u> esicular <u>t</u> ubular <u>c</u> luster
VSV-G	<u>V</u> esicular <u>s</u> tomatitis <u>v</u> irus <u>g</u> lycoprotein
wt	<u>w</u> ild <u>t</u> ype
ypt	<u>y</u> east <u>p</u> rotein <u>t</u> ransport

## Resumen

El transporte intracelular de proteínas es una actividad esencial para las células eucariotas. Mediante este proceso se llevan a cabo numerosas actividades importantes para la viabilidad celular y para la integración de la célula con el medio que la rodea. Existen dos vías principales de transporte: las Vías Endocíticas y las Vías Secretorias. Las primeras comprenden los intermediarios de transporte (vesículas y/o túbulos) que emergen de la membrana plasmática hacia el interior celular (lisosomas, endosomas, fagosomas, etc.), mientras que las segundas comprenden la salida de proteínas nacientes desde el retículo endoplásmico (RE) hacia el complejo de Golgi y luego a la membrana plasmática. En general, todas las etapas que componen estas vías ocurren mediante un mecanismo común que consiste en la generación de intermediarios de transporte a partir de un compartimiento dado, el transporte de dicho intermediario, y su posterior fusión con un compartimiento receptor. Para asegurar la correcta distribución de las proteínas en los compartimientos adecuados existen un gran número de factores y proteínas encargados de regular, dirigir y brindar especificidad a cada una de las etapas del transporte intracelular, entre los que se encuentran proteínas de cubierta, factores de reconocimiento de membranas, SNARES, Arf GTPasas, Rab GTPasas, etc. En el presente trabajo de tesis se analizaron los mecanismos mediante los cuales la GTPasa Rab1b regula el transporte de proteínas entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi. Para ello se analizó el comportamiento dinámico del ciclo de Rab1b, el rol de Rab1b en el reclutamiento de COPI, y la relación entre la función de Rab1b y la estructura del complejo de Golgi. Mediante ensayos de microscopía confocal *in vivo* se observó que Rab1b se asocia al complejo de Golgi y a los sitios de salida del retículo endoplásmico directamente desde las reservas citosólicas, y que permanece unida a sus sitios de acción de manera transitoria. Además, ensayos bioquímicos y de inmuno-fluorescencia nos permitieron caracterizar a GBF1 como una nueva proteína efectora de Rab1b y determinar que esta interacción es esencial para el reclutamiento del complejo COPI y, por consiguiente, para la maduración de los intermediarios de transporte provenientes del retículo endoplásmico. Por último, mediante ensayos de microscopía electrónica se evidenció que la función de Rab1b es vital para el mantenimiento de la estructura del Golgi sugiriendo que cambios en los niveles de Rab1b podrían ser importantes para el proceso de adaptación del Golgi en función de los distintos requerimientos celulares.

**Abstract**

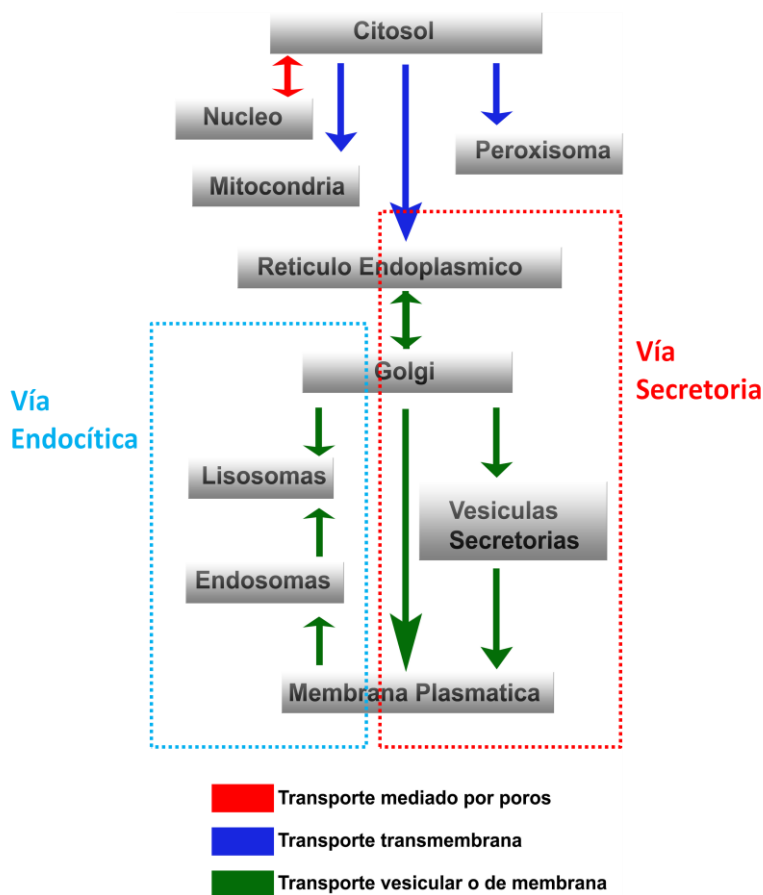
Intracellular protein transport represents an essential task for eukaryotic cells. By this process a number of important activities for cell viability and cell environment integration take place. There are two main intracellular pathways: the endocytic and the secretory pathways. The first one include the transport intermediates (vesicles/tubules) budding from the plasma membrane to lisosomes, phagosomes and the Golgi complex; while the second one represent the protein transport from the endoplasmic reticulum (ER) through the Golgi complex and the plasma membrane. The different stages that conform these pathways occur by a general mechanism consisting in the budding of a transport intermediates from a donor membrane, its transport, and finally its fusion with acceptor membranes. In order to ensure the right distribution of proteins into the correct compartments there exist a number of proteins and factors controlling, directing and giving specificity to each transport stage. Among these factors the most relevant are coat proteins, tethering factors, SNAREs, Arf GTPases, Rab GTPases, etc. In this work the mechanisms underlying the role of the GTPase Rab1b regulating the ER to Golgi transport were evaluated. In order to accomplish with that objective, we analyzed the Rab1b dynamic behavior, the role of Rab1b in COPI recruitment, and finally, the relationship between Rab1b activity and Golgi complex structure. Using in vivo confocal microscopy it was shown that Rab1b associates independently to the Golgi and to ER-exit sites directly from the cytosolic pools, and that it remains associated transiently. Moreover, biochemical as well as immuno-fluorescence assays let us characterize GBF1 as a novel Rab1b effector protein, and determine that this interaction is required for COPI recruitment and, consequently, for the maturation of transport intermediates derived from the ER. Finally, using electron microscopy techniques it was observed that Rab1b function is essential for maintaining normal Golgi structure, suggesting that changes in Rab1b levels could be important for controlling the changes underwent for the Golgi under different cell requirements.

## Introducción

Las células eucariotas están subdivididas en una serie de compartimientos funcionalmente distintos delimitados por membranas. Cada compartimiento, denominado organela, contiene su propio conjunto de proteínas y moléculas especializadas que le confieren propiedades funcionales y estructurales características. Las proteínas están involucradas en el mantenimiento de la estructura de cada organela, en la catálisis de las reacciones que en ella ocurren, en el transporte selectivo de pequeñas moléculas desde o hacia su interior, etc. En su mayoría, las proteínas son sintetizadas por ribosomas libres en el citosol o asociados al Retículo Endoplásmico (RE), excepto por aquellas sintetizadas en los ribosomas de mitocondrias y plástidos. Su destino depende de señales específicas contenidas en su secuencia de aminoácidos, que dirigen su transporte hacia el RE, hacia el núcleo, o hacia otros destinos en la célula o fuera de ella. Existen tres mecanismos generales que permiten a las proteínas transportarse de un compartimiento a otro (Figura 1), ellos son: 1) Transporte mediado por poros que funcionan como puertas selectivas que activamente transportan macromoléculas específicas permitiendo también la libre difusión de moléculas de menor tamaño; 2) Transporte trans-membrana mediado por proteínas integrales de membrana (también llamados translocadores) que selectivamente reconocen a la proteína que debe ser transportada y en un proceso dependiente de ATP la transportan hacia el lado opuesto de la membrana; 3) Transporte vesicular o de membrana, que comprende el transporte de estructuras delimitadas por membranas (vesículas y/o túbulos) que emergen de un compartimiento dado y se fusionan con otro, llevando consigo proteínas trans-membrana y moléculas solubles llamadas *cargo*.

El transporte vesicular o de membranas es un proceso altamente organizado a lo largo de vías definidas: pueden distinguirse la **Vía secretoria** y la **Vía endocítica/lisosomal** (Figura 1). La primera comprende la salida de proteínas nacientes desde el RE al complejo de Golgi y luego a la membrana plasmática, para ser secretadas al espacio extracelular; mientras que la segunda comprende los intermediarios que emergen de la membrana plasmática hacia el interior celular (lisosomas, endosomas, fagosomas, etc.). En ambos casos, el flujo general de membranas entre cada compartimiento se encuentra balanceado, con vías que equilibran el flujo en las direcciones opuestas, llevando proteínas y membranas de regreso a sus compartimientos de origen. Cada intermediario de transporte que emerge de un compartimiento debe ser altamente selectivo, es

decir, sólo debe transportar las proteínas apropiadas y debe fusionarse con el compartimiento adecuado.



**Figura 1. Mecanismos de transporte intracelular de proteínas entre organelas.**

Las flechas indican de acuerdo al color el tipo de mecanismo por el cual las proteínas se transportan de una organela a otra. Los recuadros de líneas de puntos indican las etapas que componen las dos principales vías de transporte intracelular.

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

## Vía Secretoria de proteínas

Esta vía, comprende la salida y/o transporte de proteínas recientemente sintetizadas desde el RE al complejo de Golgi y luego a la membrana plasmática. Durante su progresión en esta vía las proteínas sobrellevan una serie de modificaciones post-traduccionales tales como plegamiento, glicosilación, formación de puentes di-sulfuro, hidroxilación de residuos prolina, sulfatación de tirosinas, etc., esenciales para su posterior actividad biológica. Además de la correcta modificación de las proteínas, la vía secretoria debe cumplir una tarea esencial que es la de asegurar la precisa distribución de las proteínas y lípidos dentro de los distintos compartimientos que la integran.

Para su estudio, la vía secretoria puede ser separada en cuatro etapas diferentes: 1) translocación al RE/Control de calidad, 2) transporte RE-Golgi, 3) transporte intra-Golgi y 4) transporte post-Golgi.

### 1) Translocación al Retículo Endoplásmico y Control de calidad

Las proteínas que son transportadas en la vía secretoria contienen señales comunes en su secuencia que las dirigen al RE diferenciándolas de las proteínas citosólicas o de aquellas destinadas a mitocondrias y al núcleo (Blobel and Dobberstein, 1975). La primera etapa de la vía secretoria comienza con el reconocimiento de dicha señal por el complejo SRP (Signal Recognition Particle). Este reconocimiento ocurre al comienzo de la traducción y promueve la asociación del ribosoma con las membranas del RE. Las proteínas integrales de membrana son insertadas en las membranas del RE, mientras que las proteínas solubles son translocadas directamente al lumen del mismo (Wild et al., 2004).

En el lumen del RE existen numerosas enzimas encargadas de realizar modificaciones a las proteínas que deben ser exportadas. En su mayoría pertenecen a dos grandes familias, PDIs (Protein Disulfide Isomerase) que catalizan la formación e intercambio de puentes di-sulfuro, y PPIs (Peptide Prolyl Isomerase) que catalizan la *cis*-*trans* isomerización de residuos prolina. Además existen otras enzimas tales como  $\alpha$ -Glucosidasa-I,  $\alpha$ -Glucosidasa-II y  $\alpha$ -Manosidasa-I encargadas de la N-glicosilación asociada a residuos asparragina, como así también chaperonas



como Hsp40, Hsp70, Hsp90, Hsp100, calreticulina y calnexina las cuales promueven que el plegamiento y ensamble de las distintas subunidades proteicas sea más eficiente (Williams, 2006).

Una vez plegada y ensamblada, la proteína es sometida a un control de calidad que previene la acumulación y el transporte de proteínas defectuosas. En células de mamíferos se han descrito dos sistemas principales, ellos son el sistema de respuesta a proteínas mal plegadas, UPR (Unfolded Protein Response), y el sistema de degradación asociado al RE, ERAD (ER-Associated Degradation) (Friedlander et al., 2000; Travers et al., 2000). Estos sistemas detectan proteínas agregadas, con grupos tioles libres o incompleta N-glicosilación, y las translocan nuevamente al citosol para su posterior degradación.

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

En las membranas del retículo endoplásmico existen sitios especializados libres de ribosomas conocidos como sitios de salida del retículo endoplásmico o ERES por “ER exit sites”. Una vez que las proteínas pasan el control de calidad del RE, son reclutadas a estos sitios por un complejo de proteínas denominado COPII (coat protein II) (Barlowe et al., 1994) (Figura 2, círculos azules). El complejo COPII selecciona el material a ser exportado y participa en la deformación de la membrana necesaria para la generación de intermediarios de transporte (vesícula y/o túbulo) a partir de las membranas del RE. El paso siguiente en el transporte hacia el Golgi involucra el compartimiento intermedio (CI) (conocido también como ERGIC por ER-Golgi Intermediate Compartiment o VTC por Vesicular Tubular Clusters) formado por una red de túbulos y vesículas interconectados entre sí. Aún no se sabe si su formación se debe a la fusión homotípica entre vesículas COPII o corresponde a un compartimiento pre-existente al cual se fusionan estas vesículas (Bannykh et al., 1998). En este compartimiento se produce una discriminación de las proteínas que deben ser exportadas (transporte anterógrado) de aquellas proteínas residentes del RE que deben ser recicladas al mismo (transporte retrógrado). En las membranas del CI se produce un intercambio de la cubierta de tipo COPII por un complejo heptamérico de proteínas citosólicas denominado COPI (Figura 2, círculos rojos). Las vesículas y/o túbulos con cubierta COPI emergen desde el CI llevando el material de transporte hacia las membranas del Golgi, o bien cargando material de reciclado hacia el RE (Bonifacino and Glick, 2004; Lippincott-Schwartz and Smith, 1997; Presley et al., 1997; Stephens et al., 2000).

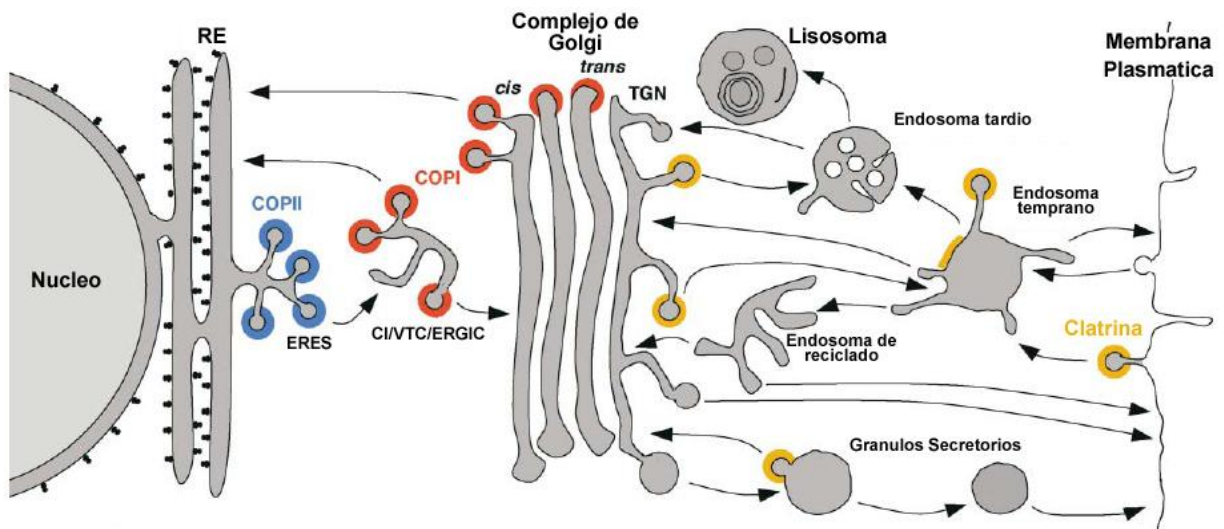
### 3) Transporte intra-Golgi

El complejo de Golgi se localiza en la zona próxima al centro organizador de microtúbulos y la envoltura nuclear. Está constituido por un conjunto de cisternas aplanadas (entre 4 y 6), una red de estructuras túbulo-vesiculares y pequeñas vesículas asociadas. Las cisternas, clasificadas en *cis*, *medial* y *trans*, poseen diferencias en su composición proteica, conteniendo enzimas necesarias para la modificación post-traducciona de las proteínas de transporte que por allí transitan (Altan-Bonnet et al., 2004). Luego de la fusión de los intermediarios de transporte provenientes del CI con las membranas del *cis*-Golgi, previa disociación de la cubierta de tipo COPI, el *cargo* es transportado a través de las cisternas del Golgi, hasta ser exportado por una red túbulo-vesicular conocida como TGN (*trans*-Golgi network)(Mironov et al., 2005).

Existen dos modelos clásicos que intentan explicar el transporte intra-Golgi, ellos son: maduración cisternal y transporte vesicular. El modelo de maduración cisternal propone que el transporte anterógrado del *cargo* ocurre en bloque con las cisternas, siendo el transporte retrógrado intra-Golgi mediado por vesículas COPI. Esto implica la generación de nuevas cisternas por fusión de intermediarios de transporte en el *cis*-Golgi y la maduración de las mismas a medida que progresan en el complejo de Golgi hasta ser desensambladas en el *trans*-Golgi (Glick and Malhotra, 1998). Por el contrario, el modelo de transporte vesicular postula cisternas de Golgi estáticas comunicadas entre si por vesículas que emergen de una cisterna y se fusionan con otra, tanto para el transporte anterógrado como para el retrógrado (Rothman and Wieland, 1996). Ambos modelos tienen “puntos débiles”: el modelo de maduración cisternal no puede explicar la presencia de *cargo* anterógrado en vesículas COPI (Pepperkok et al., 2000) ni tampoco diferencias en el flujo de transporte de distintas proteínas (Karrenbauer et al., 1990). De la misma forma, el modelo de transporte vesicular es incapaz de explicar cómo se transportan moléculas de tamaños superiores al de las vesículas de tipo COPI (por ejemplo pro-colágeno) (Mironov et al., 2001). Actualmente, se han propuesto nuevos modelos que sugieren que los mecanismos que gobiernan el transporte intra-Golgi serían una combinación de ambos modelos (Mironov et al., 2005; Patterson et al., 2008). Una población de vesículas recubiertas con COPI mediaría el transporte rápido del *cargo* entre cisternas, una segunda población de vesículas COPI mediaría el reciclado de material hacia el RE y las moléculas de gran tamaño serían transportadas con las cisternas, a medida que estas maduran, en un mecanismo independiente de la acción de vesículas COPI.

#### 4) Transporte post-Golgi

Finalmente el *cargo* abandona el complejo de Golgi en vesículas formadas a partir del TGN. Las vesículas surgidas de este compartimiento se encuentran mayoritariamente recubiertas por clatrina/complejos adaptadores proteicos e interrelacionan el complejo de Golgi con la membrana plasmática, permitiendo que las proteínas sean exportadas al espacio extracelular (Rodríguez-Boulan and Musch, 2005) (Figura 2, círculos amarillos).



**Figura 2. Vías de transporte intracelular** (modificada de (Bonifacino and Glick, 2004))

El esquema representa los distintos compartimientos de las vías secretorias y endosomales. Las flechas indican las distintas etapas de transporte, los colores indican los sitios de acción de las diferentes proteínas de cubierta (COPII, azul; COPI, rojo; Clatrina, amarillo).

### Factores que regulan el transporte de proteínas en la vía secretoria

Más allá de pequeñas diferencias, todas las etapas del transporte intracelular de proteínas en la vía secretoria incluyen la formación de un intermediario de transporte a partir de una membrana dadora, su transporte y posterior fusión con una membrana receptora. Existen una gran cantidad de factores que controlan estas etapas, entre ellos se encuentran: 1-Proteínas de cubierta; 2-Factores “tethering” o de “enlace”; 3-Factores generales de fusión; 4- Proteínas G con actividad GTPasa (Rabs, Arfs, etc).

## 1) Proteínas de cubierta

La formación de vesículas o intermediarios de transporte es iniciada por proteínas citoplasmáticas que son reclutadas sobre las membranas y participan en procesos de selección del material de transporte y de deformación (curvatura) de la membrana. Se han caracterizado distintas proteínas de cubierta que se encuentran evolutivamente conservadas en las células eucariotas, desde levaduras a mamíferos, siendo las principales el complejo COPII (coat protein II), COPI (coat protein I) y Clatrina. Estas cubiertas difieren en su composición y en su lugar de acción (Figura 2), sin embargo comparten ciertas características. Todas son reclutadas a la membrana por pequeñas proteínas G con actividad GTPasa, además, todas ellas previo al reconocimiento y fusión con el compartimiento adecuado se disocian por un mecanismo dependiente de la hidrólisis de GTP (Rothman, 1996; Schekman and Orci, 1996). A continuación se describen detalladamente las características más importantes de cada una de ellas.

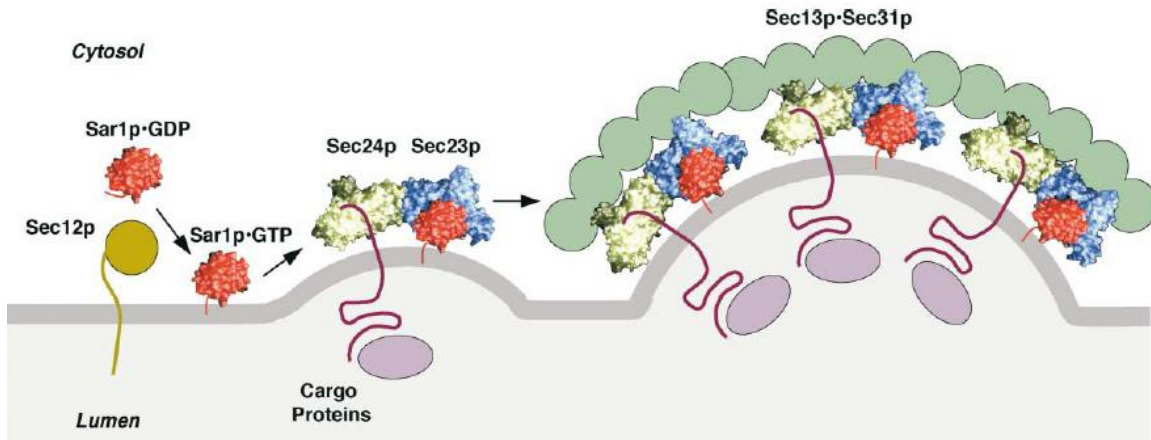
### Proteínas de cubierta COPII

El material a ser exportado desde el RE debe ser previamente seleccionado y concentrado, para luego ser empaquetado en vesículas de transporte denominadas COPII (Barlowe et al., 1994; Bonifacino and Glick, 2004). El complejo COPII está formado por diferentes subunidades (Tabla 1) como la GTPasa Sar1 y los complejos Sec23/Sec24 y Sec13/Sec31, los cuales son reclutados secuencialmente desde el citosol a las membranas de los sitios de salida del retículo endoplásmico (Matsuoka et al., 1998). Además de estas cinco subunidades, la proteína Sec12 cumple un rol importante en la formación de la cubierta COPII. Sec12 es una glicoproteína integral de membrana residente del RE que posee actividad GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor) sobre Sar1, promoviendo en ella el intercambio de GDP por GTP (Barlowe et al., 1993). Se postula que el orden de ensamblado de los distintos componentes de la cubierta COPII es el siguiente: En primer lugar Sar1-GDP es reclutada a los sitios de salida del RE, donde a través de una reacción de intercambio del nucleótido Guanina catalizado por Sec12, intercambia el grupo GDP unido por GTP (Figura 3). Luego, Sar1 “activa” (Sar1-GTP) recluta al complejo Sec23/Sec24. Sec24 interacciona con motivos citosólicos de las proteínas *cargo* que deben ser transportadas. Estas interacciones serían las responsables de seleccionar, concentrar y empaquetar dicho material en vesículas COPII (Matsuoka et al., 1998). Además de Sec24, se ha descrito que Sar1 y Sec23 también juegan un rol importante en el proceso de selección de las proteínas *cargo* que deben ser

exportadas (Giraudo and Maccioni, 2003). Una vez concluida esta etapa, el complejo Sec13/Sec31 es reclutado formando una capa externa que polimeriza en las membranas del RE y estabiliza al complejo. Esta polimerización del complejo COPII promueve la curvatura de las membranas del RE y la progresión del cargo en la vía secretoria. Por último, Sec23 estimula la actividad GTPasa de Sar1, promoviendo la hidrólisis de GTP y la disociación de la cubierta.

**Tabla 1.** Subunidades del complejo COPII (\*modificada de (McMahon and Mills, 2004))

Proteína	Subunidad	Peso Molecular	Característica
Sar1	Sar1	24 kDa	GTPasa de la familia RAS. Recluta al complejo Sec23
Complejo Sec23/Sec24 (400kDa)	Sec23	85 kDa	Actividad GAP sobre Sar1
	Sec24	105 kDa	Une al complejo Sec13. Interacciona con motivos citosólicos de proteínas cargo.
Complejo Sec13/Sec31 (700kDa)	Sec13	34 kDa	Motivos repetidos involucrados en interacciones proteína-proteína
	Sec31	150 kDa	Motivos repetidos involucrados en interacciones proteína-proteína
Sec12	Sec12	40 kDa	Proteína integral de membrana. GEF de Sar1



**Figura 3. Esquema de ensamblaje de COPII** (\*modificada de (Bonifacino and Glick, 2004))

Sar1-GDP citosólica al ser activada por Sec12, intercambia GDP por GTP y se asocia a las membranas. Sar1-GTP en las membranas recluta al complejo Sec23/Sec24. Sec24 interacciona con las proteínas cargo con dominios transmembrana seleccionando así a las proteínas que deben ser transportadas. Luego, el complejo es estabilizado por la polimerización del subcomplejo Sec13/Sec31 sobre Sec23/Sec24.

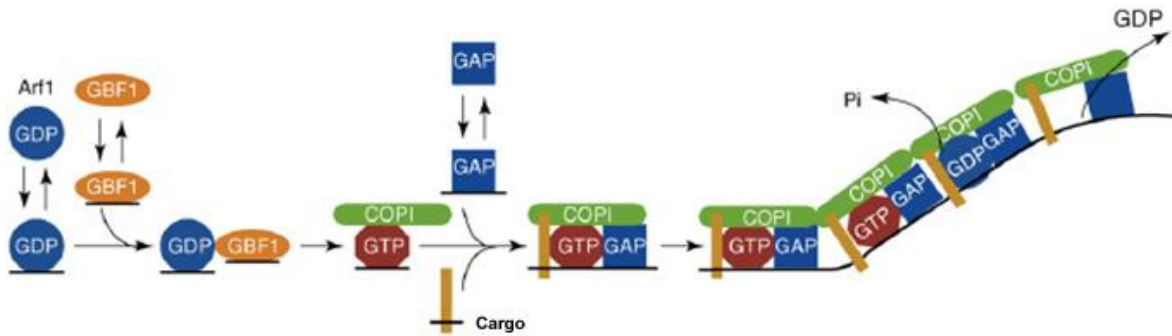
#### Proteínas de cubierta COPI

Las vesículas COPI poseen múltiples sitios de acción en diferentes etapas de la vía secretoria, incluyendo el transporte anterógrado y retrógrado entre el RE y el Golgi, intra-Golgi anterógrado, intra-Golgi retrógrado y el mantenimiento estructural y funcional del complejo de Golgi (Bethune et al., 2006). La cubierta COPI está formada por siete subunidades proteicas (COPs) y la GTPasa Arf1 (ADP ribosylation factor 1). Las siete subunidades COPs han sido denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ , y sus pesos moleculares están comprendidos en un rango amplio de 20kDa a 160kDa (Tabla 2). El complejo heptamérico se encuentra ensamblado en el citoplasma y se une a las membranas en bloque (Hara-Kuge et al., 1994). Su unión a las membranas es promovida por el intercambio de GDP por GTP en la GTPasa Arf1, proceso que produce un cambio conformacional en Arf1 quedando expuesto un dominio que contiene un residuo de ácido mirístico que le permite unirse a las membranas y promover el reclutamiento de COPI (Donaldson et al., 1992; Helms and Rothman, 1992). Esta serie de eventos desencadena la formación de vesículas o intermediarios de transporte recubiertos con COPI (Figura 4).

**Tabla 2.** Subunidades del complejo COPI (\*modificada de (McMahon and Mills, 2004))

Proteína	Subunidad	Peso Molecular	Función
Arf1	Arf1p	20 kDa	GTPasa de la familia RAS. En su forma unida a GTP inicia el reclutamiento de COPI
Complejo COPI (700kDa)	$\alpha$ -COP	160 kDa	Reclutamiento de cargo y factores accesorios
	$\beta$ -COP	110 kDa	Interacciona con dominios diacídicos del cargo
	$\beta'$ -COP	102 kDa	Reclutamiento de cargo
	$\delta$ -COP	97 kDa	Reclutamiento de cargo y factores accesorios (ArfGAP1)
	$\gamma$ -COP	57 kDa	Interacciona con proteínas accesorias
	$\epsilon$ -COP	36 kDa	Estabiliza el complejo
	$\zeta$ -COP	20 kDa	Estabiliza la interacción entre $\beta$ -COP y $\gamma$ -COP
ArfGAP1	ArfGAP1p	45 kDa	Activa la hidrólisis de GTP en Arf1 y promueve el desensamble de la cubierta

El intercambio de GDP por GTP en Arf1, es mediado por factores intercambiadores de nucleótidos Guanina (GEF) que varían según la etapa de transporte en la cual el proceso esté ocurriendo. Se han caracterizado tres GEFs para Arf1, ellos son: GBF1 (Golgi Brefeldin-resistant Factor), BIG1 y BIG2 (Brefeldin-Inhibited GEF) (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006). GBF1 se localiza en las membranas de VTCs y del *cis*-Golgi, promoviendo la progresión de los intermediarios de transporte provenientes del RE (Kawamoto et al., 2002; Garcia-Mata et al, 2003). Por otra parte, BIG1 y BIG2 se asocian a las membranas del *trans*-Golgi y endosomas (Ramaen et al., 2007). Más allá de sus diferencias en la localización sub-celular, estas tres proteínas poseen características comunes, su actividad catalítica se basa en la presencia de un dominio común que se encuentra altamente conservado en eucariotas denominado SEC7, además todas se asocian periféricamente a las membranas por mecanismos no comprendidos en su totalidad (D'Souza-Schorey and Chavrier, 2006).



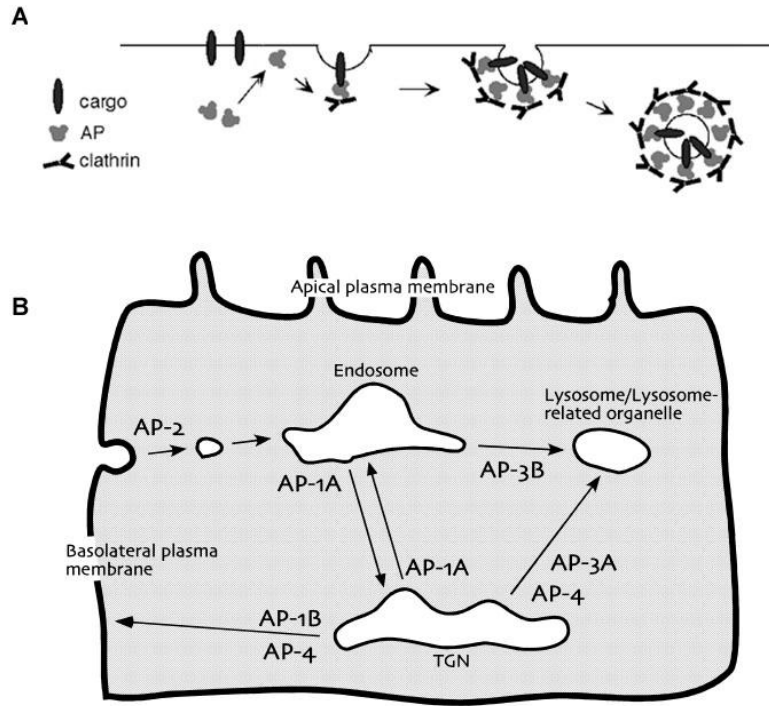
**Figura 4. Esquema de ensamblaje de COPI** (modificada de (Lippincott-Schwartz and Liu, 2006))

La GTPasa Arf1-GDP citosólica es activada por una proteína con actividad GEF (que a nivel de la interfase RE/Golgi es GBF1) intercambiando GDP por GTP y asociándose a las membranas. Una vez en las membranas recluta al complejo COPI que se encuentra previamente ensamblado en el citosol.

### Cubierta de Clatrina

Las vesículas con cubierta de clatrina están relacionadas con múltiples etapas del transporte de membranas entre *trans*-Golgi, endosomas, lisosomas y membrana plasmática. Clatrina es un trímero con un dominio central del cual se extienden tres largos dominios en forma de brazos. Durante la polimerización los brazos de trímeros vecinos interactúan entre sí formando una cubierta (McMahon and Mills, 2004). La especificidad y direccionamiento del transporte está dada por proteínas adaptadoras (AP) que reconocen señales específicas en las proteínas cargo, se asocian a las membranas y reclutan el complejo de Clatrina (Figura 5A), comenzando así con el proceso de formación de la vesícula (Dell'Angelica et al., 1997; Pearse and Robinson, 1990). Existen dos grupos principales de AP: adaptadores clásicos o tertraméricos como AP1A, AP1B, AP2, AP3A, AP3B y AP4; y adaptadores alternativos o monoméricos como GGAs y Hrs. En particular, AP-1A se asocia con membranas del TGN para facilitar el tráfico hacia los endosomas (Figura 5B), mientras que AP-1B mediaría el transporte entre el TGN y la membrana basolateral (Dietrich et al., 1997). AP-2 se asocia con la membrana plasmática para mediar la endocitosis (Haucke and De Camilli, 1999). AP-3A dirige el tráfico desde el TGN hacia los lisosomas y AP-3B desde endosomas hacia lisosomas. Por último AP-4 mediaría el transporte entre TGN y membrana basolateral, como así también entre TGN y lisosomas (Simmen et al., 2002). Los adaptadores monoméricos han sido menos estudiados, GGA mediaría la unión de clatrina a las membranas del TGN y Hrs a endosomas (Dell'Angelica et al., 2000; McMahon and Mills, 2004).





**Figura 5. Esquema de ensamblaje de clatrina a las membranas** (modificada de (Nakatsu and Ohno, 2003))

**A.** La formación de una vesícula recubierta por clatrina comienza por el reconocimiento de una proteína cargo por parte de una proteína adaptadora (AP). Luego, los trímeros de clatrina se unen a las proteínas adaptadoras y polimerizan formando la vesícula.

**B.** La especificidad y direccionamiento de las vesículas cubiertas por clatrina está dada por las AP que poseen. El esquema muestra el tipo de AP involucrado en las diferentes etapas del transporte post-Golgi.

## 2) Proteínas tethering o de enlace

El enlace o primer contacto del intermediario de transporte con la membrana de destino se encuentra mediado por los factores “tethering”. Éstos son proteínas con largos tallos citosólicos, o complejos de proteínas que se encuentran tanto en las membranas de los intermediarios de transporte como en las membranas del compartimiento receptor. El reconocimiento específico del factor tethering de una vesícula por el de una membrana receptora lleva a un acercamiento del intermediario de transporte con la membrana receptora, permitiendo la acción de factores involucrados en procesos de fusión (Figura 6). El ejemplo mejor definido de la acción de los factores tethering es el de la proteína p115 que promueve el acercamiento entre vesículas derivadas del RE y las membranas del *cis*-Golgi (Whyte and Munro, 2002). p115 se asocia a las membranas de vesículas o intermediarios de transporte derivados del compartimiento intermedio

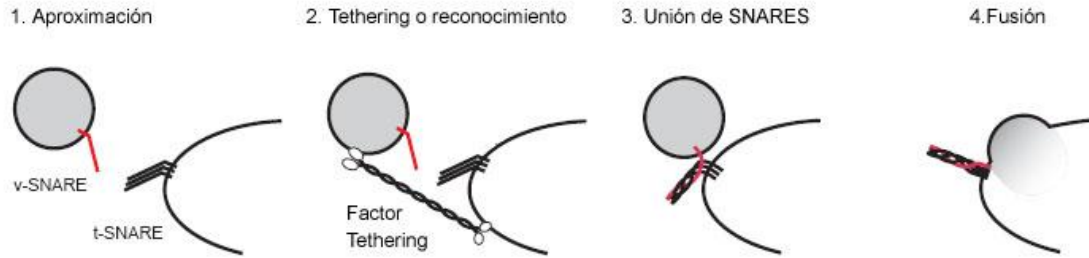
y luego reconoce específicamente a sus receptores en las membranas del *cis*-Golgi (GM130 o Giantin), brindando especificidad a la unión de la vesícula con la membrana receptora y promoviendo su fusión (Sonnichsen et al., 1998).

### 3) Factores generales de fusión de membranas

Luego del reconocimiento entre el intermediario de transporte y el compartimento receptor mediado por los factores tethering se lleva a cabo el proceso de fusión de membranas, que permite la progresión del *cargo* en la vía secretoria. En esta etapa participan un gran número de factores, entre ellos los más importantes son:

**SNARES** (**S**N**A**P **R**e**c**e**p**t**o**r**s**). Proteínas integrales de membrana que se encuentran tanto en las membranas de las vesículas o intermediarios de transporte (denominados v-SNARES, por “vesicles”) como en las membranas del compartimento receptor (denominados t-SNARES, por “target”). En su mayoría se encuentran anclados a las membranas por su dominio C-terminal, exponiendo el dominio N-terminal funcional al citosol (Bonifacino and Glick, 2004). Una vez que la vesícula y la membrana receptora se encuentran lo suficientemente cercanas, por acción de los factores tethering, los dominios N-terminales de v-SNARES y t-SNARES interaccionan. Esta interacción promueve el entrelazamiento de ambas proteínas y el acercamiento y fusión de ambos compartimentos (Figura 6).

Además de los SNARES, existen otros factores importantes para el proceso de fusión de membranas. **NSF** (**N**-ethylmaleimid-**S**e**n**s**i**t**i****v****e** **F**u**s**i**o****n** **p**r**o****t**e**i****n**), perteneciente a la familia de proteínas tipo AAA (**A**T**P**a**s****e**s **A**s**s**o**c**i**a****t****e****d****o****s** **w****i****t****h** **d****i****v****e****r****s****e** **c****e****l****l****u****l****a****r** **A**c**t****i****v****i****t****i****e****s**), es una enzima que cataliza el remodelado estructural de complejos proteicos (Lupas and Martin, 2002). NSF forma un complejo con la proteína citosólica  $\alpha$ -**SNAP** (**S**o**l****u****b****l****e** **N****S****F** **A****s****s****o****c****i****a****t****i****o****n** **P****r****o****t****e****i****n**) promoviendo el desensamble de los complejos SNAREs que quedan luego de la fusión (Leabu, 2006).



**Figura 6. Pasos en el reconocimiento y fusión de membranas** (adaptada de (Whyte and Munro, 2002))

1. Aproximación de una vesícula al compartimento de destino. 2. Enlace de la membrana de destino mediante interacción de factores tethering de la vesícula y de la membrana. 3. La unión y entrecruzamiento de v-SNARES de la vesícula con t-SNARES de la membrana de destino llevan al acercamiento de ambos compartimentos. 4. Fusión de las membranas y pasaje del cargo de la vesícula al compartimento de destino.

#### 4) Proteínas G con actividad GTPasa

La superfamilia de pequeñas proteínas G con actividad GTPasa, conocida también como RAS GTPasas, comprende un gran número de proteínas de 20 a 25 kDa con capacidad de unir GTP. Se encuentran involucradas en diversas funciones celulares tales como división celular, diferenciación, transporte vesicular, control del citoesqueleto, señalización intracelular, etc. Todas responden a un mecanismo general de acción basado en su capacidad de ciclar de una forma unida a GDP a una forma unida a GTP, desde el citosol a las membranas. El intercambio de GDP por GTP es mediado por una proteína intercambiadora de nucleótidos guanina (GEF, Guanine Nucleotide Exchange Factor) y la hidrólisis de GTP es promovida por la acción de una proteína que estimula la actividad catalítica intrínseca de las GTPasas (GAP, GTPase Activating Protein). De acuerdo a su estructura, secuencia y función, los miembros de esta superfamilia se subdividen en subfamilias, siendo las más estudiadas: Ras, Rho, Rab, Rac, Arf y Ran. De todas ellas, las GTPasas Arf y Rab poseen un rol fundamental en la regulación del transporte intracelular de proteínas (Balch, 1990; Brown et al., 1993; de Leeuw et al., 1998; Der and Balch, 2000; Donaldson et al., 1992; Goud et al., 1990; Pfeffer, 2001; Schwaninger et al., 1992).

Las Arf GTPasas (ADP-Ribosylation Factors) poseen un rol central en el transporte intracelular de lípidos y enzimas en células eucariotas. La activación de las Arfs lleva al reclutamiento de

proteínas de cubierta y de enzimas modificadoras de lípidos que a su vez regulan el reclutamiento de cargo y la deformación de las membranas asociadas a una etapa de transporte determinada (Nie et al., 2003).

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

## Rab GTPasas

### Aspectos generales

El descubrimiento de las proteínas Rab en el transporte de membranas comenzó hace más de 25 años con la caracterización del gen *sec4* (Novick et al., 1980), uno de los 23 *genes sec* que son requeridos para el transporte intracelular en *Saccharomyces cerevisiae*. Se observó que las levaduras que tenían mutado el gen *sec4* resultaban deficientes en la última etapa de secreción y se observaba un acumulo de vesículas en su interior. Sucesivos análisis de secuencia del gen *sec4* demostraron similitudes con las GTPasas Ras, así como también con otro gen de levaduras, *ypt1* (Salminen and Novick, 1987). La homología de *ypt1* con *sec4* sugería que su función también podría estar relacionada al transporte vesicular, una predicción que fue luego confirmada experimentalmente. Células con mutaciones en el gen *ypt1* eran deficientes en el transporte de proteínas desde el RE al complejo de Golgi y, al igual que las mutantes de *sec4*, se encontraban acumuladas en intermediarios vesiculares. Sec4 e Ypt1 son elementos esenciales en la vía secretoria de proteínas en levaduras, cada una en etapas específicas del transporte: Ypt1p en RE-Golgi y Sec4 en Golgi-membrana plasmática.

En el año 1990 se realizaron búsquedas en células de mamíferos de proteínas homólogas a las descritas en levaduras. Para ello se utilizaron oligonucleótidos correspondientes a dominios de unión a GTP conservados entre *sec4* e *ypt1* (Chavrier et al., 1992; Chavrier et al., 1990). Se caracterizaron una serie de secuencias con alta homología que fueron llamadas con el nombre de “Rab” debido a que se utilizaron células de cerebro de rata (Ras-like in rat Brain) para los primeros ensayos. El acrónimo Rab es ahora comúnmente utilizado para todos los miembros de esta sub-familia de proteínas, sin importar su origen. Las secuencias con un 30-85% de homología reciben un nuevo número (ej. Rab1, Rab2, Rab3), en cambio aquellas que comparten el 85% o más de homología llevan el mismo número pero distinta letra (Rab1a, Rab1b). Hasta el momento, se han caracterizado más de 60 miembros de esta sub-familia, teniendo todas un rol esencial en distintas etapas del transporte intracelular de proteínas (Pereira-Leal and Seabra, 2000; Zerial and McBride, 2001; Stenmark and Olkkonen, 2001) (Tabla 3) (Figura 7).

**Tabla 3: Proteínas Rab identificadas en mamíferos**

<b>Proteína (Isoforma)</b>	<b>Localización</b>	<b>Etapas de transporte</b>	<b>Bibliografía</b>
Rab1 (a y b)	Comp. intermedio, <i>cis</i> -Golgi	Transporte RE-Golgi	(Schwaninger et al., 1992; Nuoffer et al., 1994)
Rab2	Comp. intermedio, <i>cis</i> -Golgi	Transporte RE-Golgi	(Tisdale and Balch, 1996)
Rab3 (a, b, c y d)	Vesículas secretorias	Exocitosis dependiente de Ca <sup>2+</sup>	(Fischer von Mollard <i>et al.</i> , 1990; Oberhauser <i>et al.</i> , 1992)
Rab4 (a y b)	Endosomas de reciclado	Reciclado entre endosomas y MP	(van der Sluijs <i>et al.</i> , 1992)
Rab5 (a, b y c)	MP, Endosomas tempranos	Fusión de endosomas tempranos, transporte entre endosomas y MP	(Bucci <i>et al.</i> , 1992; Zerial, 1993; Bucci <i>et al.</i> , 1995)
Rab6	Golgi	Transporte intra-Golgi retrógrado	(Goud <i>et al.</i> , 1994; Martinez <i>et al.</i> , 1994)
Rab7	Endosomas tardíos	Transporte entre endosomas tempranos y tardíos	(Feng <i>et al.</i> , 1995; Meresse <i>et al.</i> , 1995)
Rab8 (a y b)	TGN y membrana basolateral	Transporte Golgi-membrana basolateral en células polarizadas	(Huber <i>et al.</i> , 1993)
Rab9	Endosomas tardíos, TGN	Transporte entre TGN y endosomas	(Lombardi <i>et al.</i> , 1993)
Rab10	Vesículas de Golgi y post-Golgi	Transporte Golgi-membrana basolateral en células polarizadas	(Schuck <i>et al.</i> , 2007)
Rab11 (a y b)	TGN, endosomas de reciclado, vesículas post-Golgi	Transporte endosomas de reciclado-TGN y TGN-membrana basolateral. Compartimentalización de endosomas tempranos.	(Urbe <i>et al.</i> , 1993; Chen <i>et al.</i> , 1998; Wilcke <i>et al.</i> , 2000)
Rab12	Golgi y vesículas secretorias.	Asociada a granulos secretorios en miocitos y en células de sertoli.	(Olkkonen <i>et al.</i> , 1993; Iida <i>et al.</i> , 1996; Iida <i>et al.</i> , 2005)
Rab13	RE, TGN y “tight junctions” en células polarizadas	Mantenimiento de la polaridad celular. Transporte entre TGN y RE.	(Marzesco <i>et al.</i> , 2002; Nokes <i>et al.</i> , 2008)
Rab14	TGN y endosomas	Transporte de TGN a membrana apical	(Kitt <i>et al.</i> , 2008)
Rab15	Endosomas tempranos	Específicamente expresada en cerebro de rata. Regulador negativo de endocitosis.	(Elferink <i>et al.</i> , 1992; Zuk and Elferink, 1999)
Rab17	Membrana basolateral, endosomas de reciclado	Específica de células epiteliales. Regula El tráfico a través de endosomas de reciclado.	(Lutcke <i>et al.</i> , 1993; Zacchi <i>et al.</i> , 1998)

Rab18	RE y Cuerpos lipídicos en células hepáticas.	Movilización de lípidos.	(Ozeki <i>et al.</i> , 2005)
Rab19	ND	Expresión específica de tejido. Altos niveles de mRNA en intestino, pulmón y bazo	(Lutcke <i>et al.</i> , 1995)
Rab20	RE	Expresión específica en riñón y células epiteliales.	(Das Sarma <i>et al.</i> , 2008)
Rab21	RE en células no polarizadas. Membrana apical y endosomas tempranos en células polarizadas.	Adhesión celular y endocitosis en células polarizadas.	(Opdam <i>et al.</i> , 2000; Simpson <i>et al.</i> , 2004; Pellinen <i>et al.</i> , 2006; Pellinen <i>et al.</i> , 2008)
Rab22a	Endosomas tempranos y tardíos.	Funcionalidad de endosomas. Tráfico entre endosomas.	(Mesa <i>et al.</i> , 2001; Kauppi <i>et al.</i> , 2002; Mesa <i>et al.</i> , 2005; Magadan <i>et al.</i> , 2006)
Rab23	ND	Expresión predominante en sistema nervioso central. Posible rol en vías de señalización intracelular.	(Guo <i>et al.</i> , 2006; Wang <i>et al.</i> , 2006; Hou <i>et al.</i> , 2008; Yang <i>et al.</i> , 2008)
Rab24	RE, <i>cis</i> -Golgi, ERGIC.	Autofagia. Degradación de proteínas mal plegadas.	(Maltese <i>et al.</i> , 2002; Munafo and Colombo, 2002)
Rab25	ND	Expresión ligada a metástasis y agresividad tumoral.	(Caswell <i>et al.</i> , 2007)
Rab26	Gránulos secretorios en paratiroides.	Expresión en páncreas, riñón, cerebro, paratiroides y pulmón. Reclutamiento de gránulos secretorios en MP.	(Yoshie <i>et al.</i> , 2000; Nashida <i>et al.</i> , 2006)
Rab27 (a y b)	Vesículas secretorias.	Exocitosis. Detectada en melanocitos, plaquetas, y gran variedad de células.	(Izumi <i>et al.</i> , 2003; Fukuda, 2008)
Rab28 (s y l)	ND	Rab28s detectada en la mayoría de los tejidos. Rab28l, es predominante en testículo. Función ND.	(Brauers <i>et al.</i> , 1996)
Rab30	Golgi	Expresión Ubicua.	(Chen <i>et al.</i> , 1996; de Leeuw <i>et al.</i> , 1998)
Rab33 (a y b)	<i>medial</i> -Golgi	Transporte intra Golgi. Formación de autofagosomas.	(Zheng <i>et al.</i> , 1998; Fukuda and Itoh, 2008; Itoh <i>et al.</i> , 2008)

\*ND: No determinado. MP: Membrana Plasmática. TGN: Trans-Golgi. RE: Retículo endoplasmático

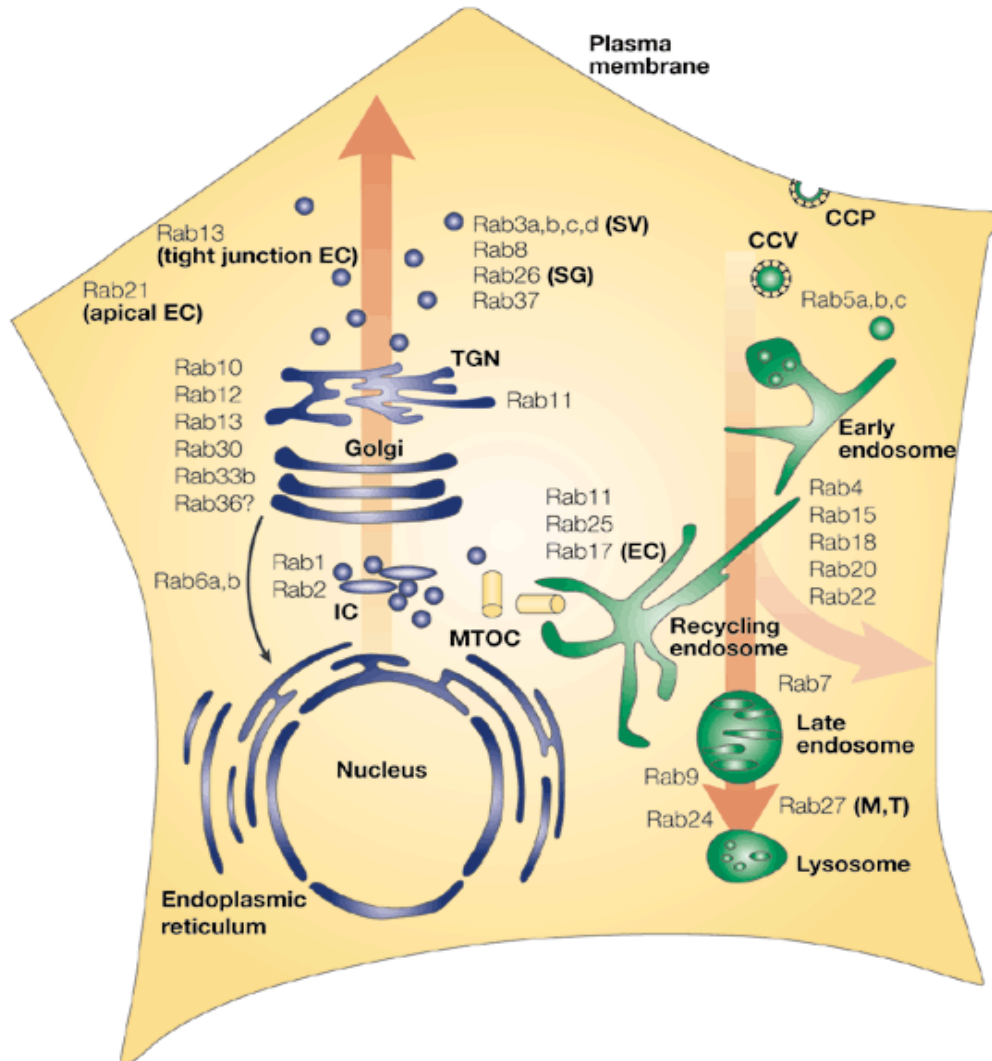
**Conservación evolutiva de su función**

A lo largo de la evolución, las proteínas Rab se encuentran altamente conservadas. En algunos casos, las proteínas Rab de levaduras y mamíferos son funcionalmente intercambiables. Rab1a humana puede complementar la pérdida de Ypt1 en *S. cerevisiae* (Haubruck et al., 1989); Rab8, puede complementar mutaciones que alteran la función de Ypt2 en *S. pombe* (Craighead et al., 1993); Ypt51, homóloga a la proteína de mamíferos Rab5, es también requerida en endocitosis. Además, la expresión de Ypt51 en células de mamíferos no solo co-localiza con Rab5, sino que también puede estimular la endocitosis (Singer-Kruger et al., 1995).

**Modificaciones Post-traduccionales**

Las proteínas Rab pueden encontrarse de forma citosólica o asociadas a membranas. Su unión a membranas está dada por una modificación post-traducciona donde un doble grupo geranilgeranil (o prenilo) se asocia a las cisteínas del extremo C-terminal (Desnoyers et al., 1996). Esta modificación es catalizada por la enzima GGT II (Geranil-Geranil Transferasa II) (Farnsworth et al., 1994), la cual está compuesta por un núcleo catalítico (formado por un complejo de subunidades A y B) y un componente accesorio REP (Rab Escort Protein). REP forma un complejo con las proteínas Rab recién sintetizadas unidas a GDP y las presenta al núcleo catalítico de la enzima (Seabra et al., 1992). Luego de que la reacción de prenilación ocurre, REP remueve a la proteína Rab del complejo catalítico y la lleva a las membranas (Wilson et al., 1996).



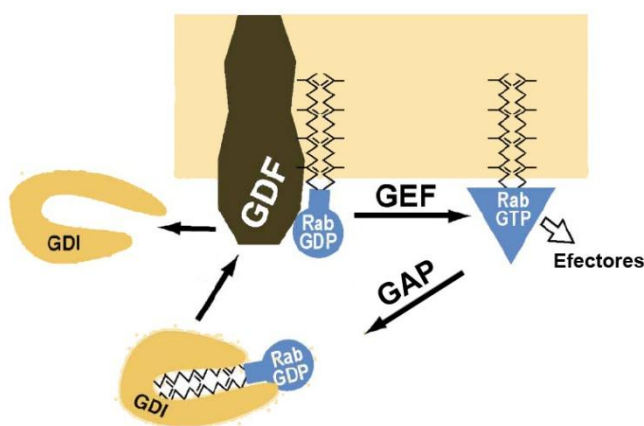


**Figura 7. Familia de proteínas Rab-GTPasas** (extraído de (Stenmark and Olkkonen, 2001))  
 En mamíferos se han descrito más de 60 proteínas pertenecientes a esta familia. En la figura se muestra un esquema con la localización subcelular de algunas de ellas.

### Mecanismo General de acción

En forma semejante a todas las proteínas de la familia de las RAS, las Rab GTPasas ciclan de su forma inactiva (unida a GDP) a su forma activa (unida a GTP) (Martinez and Goud, 1998) (Figura 8). La forma unida a GDP se encuentra principalmente soluble en el citosol, asociada a una proteína GDI (GDP Dissociation Inhibitor) que recubre al grupo prenilo del extremo C-terminal de las Rabs

(Pfeffer et al., 1995). En las proximidades del lugar de acción, la proteína GDI es desplazada por proteínas integrales de membrana denominadas GDFs (GDI Dissociation Factors), de esta manera el grupo prenilo queda expuesto al citosol y permite que la proteína Rab se asocie a las membranas. Una vez en las membranas las proteínas Rab intercambian el grupo GDP por GTP, en un proceso mediado por un factor intercambiador de nucleótidos guanina (GEF), y actúan interaccionando con distintas proteínas (denominadas efectores) en diferentes etapas del la vía secretoria (Segev, 2001a; Segev, 2001b; Takai et al., 2001). Luego de la interacción con efectores, las proteínas Rab hidrolizan el GTP unido y se liberan de las membranas en un mecanismo mediado por una proteína (GAP, GTPase Activating Protein) que activa la actividad GTPasa intrínseca de las Rabs (Cuif et al., 1999).



**Figura 8. Mecanismo general de acción de las Rab-GTPasas** (modificado a partir de (Collins, 2003)).

La proteína GDI es desplazada por proteínas integrales de membrana denominadas GDFs (GDI Dissociation Factors), permitiendo que la proteína Rab se asocie a las membranas. En las membranas, por acción de una proteína GEF, cambian GDP por GTP y actúan interaccionando con distintos efectores. Luego una proteína GAP (GTPase Activating Protein) cataliza la hidrólisis de GTP y promueve la disociación de la Rab de las membranas

Como se mencionó anteriormente, hasta el momento se han caracterizado más de 60 miembros pertenecientes a la familia de las proteínas Rab, los cuales se encuentran localizados específicamente en compartimientos intracelulares de las vías secretorias, endocíticas y lisosomales (Tabla 3 y Figura 7). Los factores que brindan especificidad a su localización son muchos y aún no están del todo comprendidos. Debido a que en el extremo C-terminal de las proteínas Rab GTPasas existe el mayor grado de divergencia entre los distintos miembros de la familia, se postuló que esta región podría actuar como señal para la localización sub-celular específica de las distintas proteínas Rab. En base a esto, se realizaron numerosos ensayos para evaluar el rol de los residuos C-terminales en la localización subcelular de estas proteínas. Se observó que el reemplazo del residuo C-terminal de Rab5 por el correspondiente residuo C-

terminal de Rab7 generaba una construcción con localización en endosomas positivos para Rab7 (Chavrier et al., 1991). En concordancia, la construcción de Rab6 conteniendo el extremo C-terminal de Rab5 se localizó en endosomas tempranos positivos para Rab5 (Stenmark et al., 1994). Estos resultados fortalecieron la hipótesis de que la región C-terminal de las GTPasas Rab era quien determinaba su localización específica. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que esta región no representaba una señal de localización general para las proteínas Rabs ya que las regiones C-terminales de Rab1, Rab2 y Rab7 no eran capaces de alterar la localización endosomal de Rab5 (Ali et al., 2004), indicando que además de las secuencias C-terminales, debe haber otros factores involucrados en la correcta localización de las proteínas Rab. En este sentido, en la actualidad se considera que la especificidad de unión de una proteína Rab a una membrana determinada está dada por un conjunto de factores entre los cuales se encuentran: las secuencias de sus dominios C-terminales; los factores GEF, GDFs y GAPs; y las distintas proteínas efectoras (Collins, 2003; Pfeffer and Aivazian, 2004; Seabra and Wasmeier, 2004).

### **Estructura de las proteínas Rab. Bioquímica de las mutaciones puntuales**

Estructuralmente las proteínas Rab están conformadas por una serie de motivos conservados denominados G1, G2, G3, G4 y G5, que en conjunto forman un dominio G común a todas las GTPasas de las familias de las RAS. Además, presentan en su secuencia un sitio de fosforilación y una región C-terminal hiper-variable (35-45 aminoácidos) que muestra el mayor grado de divergencia entre los distintos miembros de la familia y es donde ocurre el agregado post-traduccional de grupos geranyl-geranyl o prenilo (Wennerberg et al., 2005). Debido a sus características estructurales, una de las herramientas más utilizadas para el estudio de las proteínas Rab es la generación de mutaciones puntuales en dominios conservados, produciendo la estabilización de las proteínas Rab en su forma unida a GTP, GDP o libre de nucleótidos (Feig and Cooper, 1988). De esta forma, la sustitución de un residuo Asparagina (N) por Isoleucina (I) en la región G2, resulta en la disminución de la afinidad tanto por GDP como por GTP, generándose una mutante dominante negativa. La sustitución de Serina (S) o Treonina (T) por Asparagina (N) en el sitio de fosforilación también genera una mutante dominante negativa con gran preferencia por GDP. En cambio, la sustitución de Glutamina (Q) por Leucina (L) en el sitio de unión de nucleótidos guanina bloquea la actividad GTPasa intrínseca estabilizando a las proteínas Rab en su forma

activa, unida a GTP. Para el caso específico de la GTPasa Rab1b las mutaciones puntuales más utilizadas son: 1) Rab1bQ67L que bloquea la actividad GTPasa y estabiliza la forma Rab1b-GTP; 2) Rab1bS22N, que presenta baja afinidad por GTP y estabiliza la forma Rab1-GDP; 3) Rab1bN121I, la cual posee baja afinidad por GDP y por GTP, y permanece principalmente libre de unión a nucleótidos.

### **Patologías humanas que involucran Rab GTPasas**

El transporte de proteínas entre organelas como así también la secreción de las mismas al espacio extra-celular son mecanismos esenciales para el mantenimiento de la composición normal de las membranas y para la inter-relación entre la célula y el medio circundante. Existen numerosas patologías que involucran desórdenes en diversas etapas del transporte intracelular, entre las cuales existen muchas que involucran actividades anómalas de proteínas Rab GTPasas. Estos desórdenes pueden ser mono-génicos o multi-factoriales.

Los desórdenes mono-génicos corresponden a enfermedades causadas por mutaciones en un solo gen, tanto de una Rab GTPasa como de una proteína estrechamente relacionada a su función (GDI, REP, GGT, GAP, GEF, etc.). Entre ellos, los más estudiados son: 1) **síndrome de Griscelli**, que cursa con hipo-pigmentación y defectos en la respuesta inmune, causado por una mutación en el gen que codifica para Rab27 (Menasche et al., 2000); 2) **Coroidermia**, degeneración de la retina y pérdida progresiva de la visión, causado por una mutación en el gen REP1 que lleva a una falla en la prenilación de Rab27 en la retina (Seabra et al., 1993); 3) Enfermedad de **Charcot-Marie-Tooth**, neuropatía periférica que cursa con debilidad muscular y ulceraciones e infecciones en los pies, causada por mutaciones en el gen de Rab7 (Verhoeven et al., 2003).

Con respecto al rol de las Rab GTPasas en desórdenes multi-factoriales, existen evidencias que indican que mutaciones en proteínas Rab estarían involucradas en la progresión de determinadas patologías. Por ejemplo, se ha evidenciado que el incremento en la expresión de Rab25 se encuentra relacionado a la agresividad de los tumores presentes en **cáncer de ovario y en cáncer de mama** (Cheng et al., 2004); en **cáncer de lengua** se ha detectado expresión aberrante de Rab1 (Shimada et al., 2005); también se ha evidenciado que la sobre-expresión de Rab1 puede suprimir

la neuro-degeneración inducida por la proteína  $\alpha$ -synuclein en la **enfermedad de Parkinson** (Chua and Tang, 2006), etc.

En este sentido, el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales las Rab GTPasas regulan distintas etapas del transporte intracelular de proteínas representa un desafío importante, no solo para el entendimiento global del proceso de transporte intracelular, sino también para la generación de nuevas aproximaciones que lleven a desarrollar nuevos tratamientos para patologías relacionadas a desórdenes en el transporte intracelular de proteínas.

## Rab1, estado actual del conocimiento

Hasta el presente se han caracterizado dos isoformas de la GTPasa Rab1, Rab1a y Rab1b, que poseen un 92% de homología en sus secuencias de aminoácidos (sus divergencias existen principalmente a nivel de los dominios C-terminales) (Touchot et al., 1987). A pesar de las pequeñas divergencias en sus secuencias, no se han caracterizado diferencias en sus funciones. Ambas son esenciales para el transporte de proteínas entre el RE y el complejo de Golgi (Schwaninger et al., 1992) y sufren el agregado de dos grupos geranil-geranil luego de su traducción (Farnsworth et al., 1994). Además, ensayos de micro-inyección de Rab1a o Rab1b en células que expresan la construcción dominante negativa sugirieron que sus funciones podrían ser intercambiables (Nuoffer et al., 1994).

Se han identificado 6 efectores de Rab1, ellos son: p115 (Allan et al., 2000), GM130 (Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001), Golgin84 (Satoh et al., 2003), MICAL-1 (Weide et al., 2003), Iporin (Bayer et al., 2005) y Giantin (Beard et al., 2005). P115, GM130 y Giantin son proteínas involucradas en etapas de reconocimiento y fusión de membranas entre RE y Golgi. p115 se encuentra asociada por su extremo N-terminal a las membranas de los intermediarios de transporte, GM130 se asocia mediante su interacción con GRASP65 a las membranas del *cis*-Golgi, exponiendo su dominio N-terminal al citosol. Giantin, es una proteína transmembrana que posee un largo dominio N-terminal citoplasmático. Se ha propuesto que la interacción de Rab1 con estas proteínas podría tener muchas funciones, por un lado Rab1 con p115 sería la responsable de la unión de p115 a las membranas de los intermediarios de transporte con cubierta COPII, programándolos así para la fusión con las membranas del *cis*-Golgi (Allan et al., 2000). Además, se ha propuesto que la unión de Rab1 a estas tres proteínas generaría cambios conformacionales que favorecerían la interacción de sus extremos C-terminales, promoviendo así el proceso de fusión heterotípica (Beard et al., 2005) (entre vesículas y la membrana receptora). Golgin84 es una proteína estructural del complejo de Golgi, la interacción con Rab1 podría tener un rol en el mantenimiento de la arquitectura del Golgi (Satoh et al., 2003). MICAL-1 es una proteína citosólica que interacciona con el cito-esqueleto celular, su interacción con Rab1 podría tener como función el anclado del complejo de Golgi a los filamentos intermedios del cito-esqueleto (Weide et al., 2003). Iporin es una proteína citosólica que podría estar involucrada en vías de señalización, se sugiere que su interacción con Rab1 relacionaría el direccionamiento de los intermediarios de transporte

con vías de señalización (Bayer et al., 2005). Además ha sido determinado que Rab1 participa en el reclutamiento a las membranas del complejo proteico COPI y que su función sería previa a la de GBF1 (Alvarez et al., 2003). Específicamente se observó que la expresión de la construcción dominante negativa de Rab1b (conteniendo la mutación puntual N121I) interfiere con la asociación a membranas de  $\beta$ -COP (componente del complejo COPI), mientras que la sobreexpresión de la construcción constitutivamente activa de Rab1 (Rab1bQ67L) confiere a las células resistencia a BFA (agente inhibidor del reclutamiento de COPI). Asimismo, el efecto inhibitorio ejercido por Rab1bN121I sobre el reclutamiento de COPI es revertido por la expresión de GBF1. Estas evidencias sugieren una relación funcional entre Rab1 y GBF1 para mediar el reclutamiento de COPI.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es analizar los mecanismos celulares y moleculares que regulan el transporte de proteínas desde el Retículo Endoplásmico al complejo de Golgi. Concretamente el proyecto está enfocado en el estudio de la función de la GTPasa Rab1b.

### Objetivos específicos

Con el fin de evaluar integralmente la función de Rab1b en la vía secretoria de proteínas, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

***1- Caracterizar el comportamiento dinámico del ciclo de Rab1b***

***2- Analizar la función de Rab1b a nivel de los sitios de salida del retículo endoplásmico***

***3- Evaluar la relación entre la función de Rab1b y la estructura del complejo de Golgi***

Los objetivos planteados fueron abordados en su totalidad durante el transcurso de este trabajo de tesis. Los resultados obtenidos se encuentran descriptos a continuación, cada uno en un capítulo distinto.

Los resultados descriptos en los capítulos 1 y 2 forman parte de un artículo titulado:

***“Rab1b directly interacts with GBF1 and modulates both Arf1 association and COPI recruitment”***

Publicado en Molecular Biology of the Cell (Monetta et al., 2007)

Los resultados descriptos en el capítulo 3 forman parte de un manuscrito en preparación titulado:

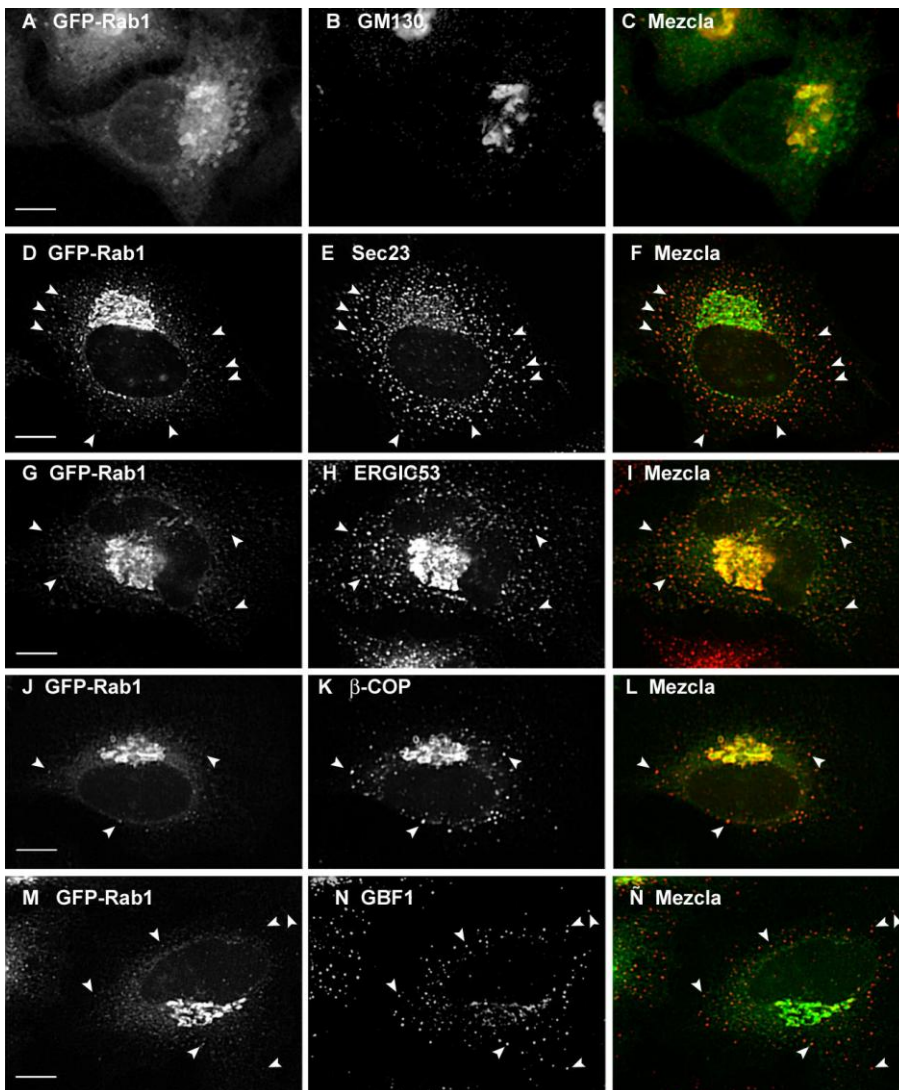
***“Structure of the Golgi complex in response to Rab1b activity”***



## ***Capítulo 1***

### Caracterización del comportamiento dinámico del ciclo de Rab1b

En células de mamíferos la GTPasa Rab1b se localiza concentrada en la región yuxta-nuclear y en un punteado periférico en el citosol celular (Figura 9). La región yuxta-nuclear co-localiza con GM130 (marcador de *cis*-Golgi) (Figura 9 A-C), mientras que las estructuras periféricas co-localizan parcialmente con Sec23,  $\beta$ -COP, ERGIC53 y GBF1 (marcadores de ERES/VTCs) (Figura 9 D-Ñ, flechas).



**Figura 9. Rab1b se localiza en Golgi y la interfase entre COPII/COPI.**

Ensayos de microscopía de fluorescencia en células HeLa trasfectadas con GFP-Rab1bwt por 48 horas. Los paneles muestran imágenes correspondientes a ensayos de inmuno-fluorescencias realizados con distintos anticuerpos: anti-GFP, para detectar las células transfectadas (paneles A, D, G, J, M); anti-GM130 utilizado como marcador de Golgi (panel B); anti-Sec23 utilizado como marcador de COPII (panel E); anti-ERGIC-53 como marcador de VTCs (panel H); anti- $\beta$ -COP como marcador de COPI (panel K); anti-GBF1 como marcador de interfase COPII/COPI (panel N). Las flechas indican las estructuras donde se observa colocalización. Las barras de tamaño representan 10  $\mu$ m.

Si bien su localización sub-celular se encuentra bien caracterizada, se desconoce cómo llega Rab1 a cada uno de sus lugares de acción, como así también cuánto tiempo permanece asociada a las membranas. Es posible que Rab1-GTP se asocie a las membranas de los sitios de salida del retículo endoplásmico (ERES) en un paso previo a la formación de estructuras túbulo-vesiculares (VTCs), y que luego viaje asociada a los VTCs hasta el complejo de Golgi. Alternativamente, Rab1 podría ser reclutada a las membranas de ERES, VTCs y complejo de Golgi en eventos independientes y ciclar desde el citosol a estas membranas sin ser transportada por las mismas. Para analizar estas posibilidades se realizaron ensayos de microscopía confocal *in vivo* con el fin de evaluar el comportamiento dinámico de Rab1.

Existen diversas metodologías para evaluar el comportamiento dinámico de proteínas en células eucariotas. En general, todas utilizan construcciones donde la proteína de interés se expresa fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP, Green Fluorescent Protein), de esta manera, mediante un microscopio de fluorescencia, es posible identificar a la proteína de fusión en forma directa en células vivas. Entre las metodologías más utilizadas se encuentran la técnica de “Time Lapse Imaging” (Lippincott-Schwartz et al., 1999) y la técnica de recuperación de la fluorescencia luego del foto-blanqueado (FRAP, Fluorescence Recovery After Photobleaching) (Presley et al., 2002).

La técnica de “**Time Lapse Imaging**” se utiliza principalmente para evaluar el comportamiento dinámico de proteínas asociadas a estructuras de membranas. Consiste en tomar fotos secuenciales a intervalos de tiempo iguales durante un período de tiempo determinado (los tiempos deben ser ajustados experimentalmente y dependen de la dinámica de la estructura estudiada). Luego, con las fotos se compagina un video y de esa forma se visualiza el comportamiento dinámico de la proteína de interés. Mediante esta metodología se ha evaluado el comportamiento dinámico de numerosos marcadores sub-celulares tales como componentes de los complejos COPII (marcadores de ERES), COPI (marcadores de VTCs), etc. (Stephens et al., 2000; Ward et al., 2001). Por ejemplo, se ha descrito que las estructuras marcadas con GFP-Sec13 (componente del complejo COPII), presentan un comportamiento dinámico limitado, permaneciendo estáticas por períodos de tiempo prolongados, sin viajar asociadas a los intermediarios de transporte desde la periferia hasta el complejo de Golgi (Stephens et al., 2000). Por el contrario, la proteína de VTCs, ERGIC53, presenta alta movilidad, siendo transportada desde

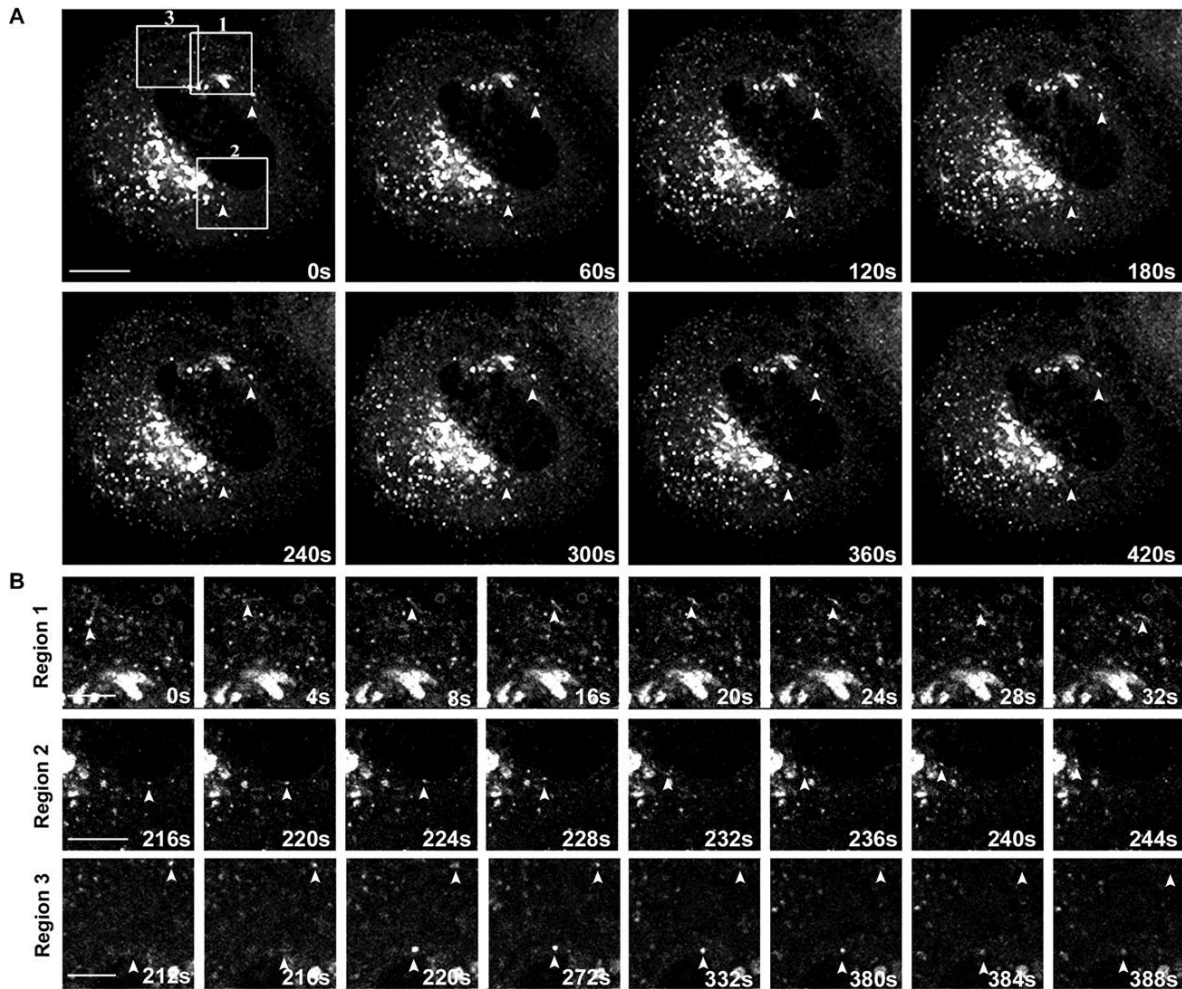
la periferia hasta el complejo de Golgi asociada a las membranas de los intermediarios de transporte (Ward et al., 2001).

La técnica de **FRAP** se utiliza para evaluar la dinámica de asociación o disociación de una proteína a una membrana. Se visualiza en un microscopio de fluorescencia una célula transfectada con la proteína de interés fusionada a GFP. Luego, se foto-blanquea (destrucción irreversible de la fluorescencia mediante exposición a altas intensidades de luz de una determinada longitud de onda) una región de interés (Golgi, membrana plasmática u otra estructura de membrana en el interior celular) donde se encuentre asociada la proteína a analizar. Posteriormente se toman fotos secuenciales por períodos de tiempo similares con el fin de compaginar un video y observar la recuperación de la fluorescencia en el área foto-blanqueada. De esta forma, la recuperación de la intensidad de fluorescencia en el área seleccionada es debida al ingreso al área de interés de nuevas moléculas fluorescentes provenientes de una región externa al área que fue foto-blanqueada. Existen dos parámetros principales para analizar en un ensayo de FRAP, el porcentaje de fluorescencia recuperado y el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) con que ocurrió dicha recuperación. El porcentaje de fluorescencia recuperada está relacionado a la capacidad de una molécula de ser reemplazada por nuevas moléculas fluorescentes. La recuperación del 100% de la fluorescencia inicial indica que la totalidad de las moléculas pudieron ser reemplazadas por nuevas moléculas fluorescentes durante el transcurso del experimento, en cambio, si la recuperación no alcanza el 100% indica que un porcentaje de las moléculas foto-blanqueadas se encuentra establemente asociada a las membranas y no pueden ser reemplazadas por la llegada de nuevas moléculas. El  $t_{1/2}$  es el tiempo en el cual se recupera el 50% de la fluorescencia inicial y está relacionado al mecanismo por el cual la proteína de interés llega a las membranas. En general las proteínas que ciclan continuamente desde el citosol a las membranas presentan  $t_{1/2}$  cortos (Arf1 15 a 45 segundos (Presley et al., 2002; Vasudevan et al., 1998),  $\epsilon$ -COP 20 a 30 segundos (Presley et al., 2002; Ward et al., 2001), GBF1 15 a 40 segundos (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005)) en cambio las proteínas que alcanzan las membranas mediante el transporte mediado por microtúbulos presentan  $t_{1/2}$  más prolongados (p58, 15 minutos; GalT, 50 minutos) (Ward et al., 2001).

Utilizando estas dos metodologías se analizó el comportamiento dinámico de Rab1b asociada a las estructuras periféricas, como así también la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las membranas del complejo de Golgi.

### **1.1. Dinámica de Rab1b asociada a las estructuras periféricas**

Rab1 asociada a las estructuras periféricas co-localiza tanto con marcadores de ERES (Figura 9, D-F) como con marcadores de VTCs (Figura 9, G-Ñ). Como se mencionó anteriormente estos compartimientos poseen diferentes patrones de movimiento, por lo tanto se decidió evaluar si Rab1 a nivel de los sitios de salida del RE presentaba una dinámica similar a la de estructuras COPII, o si por el contrario permanecía asociada a los VTCs viajando con ellos desde la periferia celular hasta el complejo de Golgi. Mediante la técnica de Time Lapse Imaging, se evaluó el comportamiento dinámico de Rab1 asociada a las estructuras periféricas. Se transfectaron células HeLa con un vector que expresa la proteína fluorescente verde fusionada al extremo N-terminal de Rab1b (GFP-Rab1bwt) y se crecieron durante 48 horas a 37°C. Las células transfectadas se identificaron en un microscopio de fluorescencia confocal y se tomaron fotos cada 4 segundos durante un tiempo total de 10 minutos. Las fotos se compilaron en un video y se analizó la movilidad de GFP-Rab1 asociada a las membranas de las estructuras periféricas (Video 1 en disco adjunto). Las estructuras periféricas marcadas con GFP-Rab1 se clasificaron de acuerdo a su comportamiento dinámico como inmóviles, móviles y transitorias. Se consideraron inmóviles aquellas estructuras que permanecieron por un tiempo superior a 5 minutos en un radio de 2  $\mu\text{m}$ , sin presentar una trayectoria definida (Figura 10 A, flechas); se consideraron móviles aquellas estructuras que describieron una trayectoria superior a 2  $\mu\text{m}$  en cualquier dirección (Figura 10 B, regiones 1 y 2, flechas); y transitorias aquellas estructuras que aparecieron o desaparecieron durante el tiempo total del experimento (Figura 10 B, región 3, flechas). De acuerdo a estos patrones se contaron 756 estructuras en 7 células diferentes correspondientes a 3 ensayos independientes. Los datos, resumidos en la tabla 4, muestran que el 71% de las estructuras marcadas por GFP-Rab1b presentaron un comportamiento transitorio, el 23% se mantuvieron inmóviles y solo el 6% describieron una trayectoria definida. En paralelo, se realizaron ensayos utilizando marcadores de COPII (Sec13) y de VTCs (p58) con el fin de comparar con los resultados obtenidos para Rab1b (Videos 2 y 3 en disco adjunto). En concordancia con lo publicado, las estructuras marcadas con Sec13 presentaron principalmente patrones inmóviles (86%), mientras que la mayor cantidad de las estructuras marcadas con p58 (57%) describieron largas trayectorias, desde y hacia el Golgi (Tabla 4). Estos resultados sugieren que Rab1 se asocia a las membranas de los sitios de salida del retículo endoplásmico y que luego se disocia sin viajar con estas estructuras hacia las membranas del *cis*-Golgi.



**Figura 10. Dinámica de Rab1b asociada a las estructuras periféricas.**

Ensayos de Time Lapse de las estructuras periféricas marcadas con GFP-Rab1bwt. Se tomaron imágenes cada 4 segundos durante un tiempo total de 10 minutos en un microscopio de fluorescencia confocal. Las fotos se compilaron y se generó un video para evaluar la dinámica de las estructuras.

**A.** Los paneles muestran imágenes extraídas del video cada 60 segundos representando tiempos de 0 a 420 segundos. Las flechas señalan dos estructuras que se mantienen inmóviles durante el tiempo total del experimento. Los recuadros blancos indican las regiones seleccionadas mostradas en B. Las barras representan 10  $\mu\text{m}$ .

**B.** Comportamientos dinámicos de las estructuras periféricas. Las imágenes fueron extraídas de los recuadros indicados en A a los tiempos indicados. Regiones 1 y 2 muestran estructuras móviles que describen largas trayectorias periféricas (flechas, Región 1) o emergen de la periferia y se dirigen al Golgi (flechas, Región 2). Región 3 muestra dos estructuras con dinámica transitoria que aparecen y luego desaparecen en un corto período de tiempo (flechas). Las barras de tamaño representan 5  $\mu\text{m}$ .

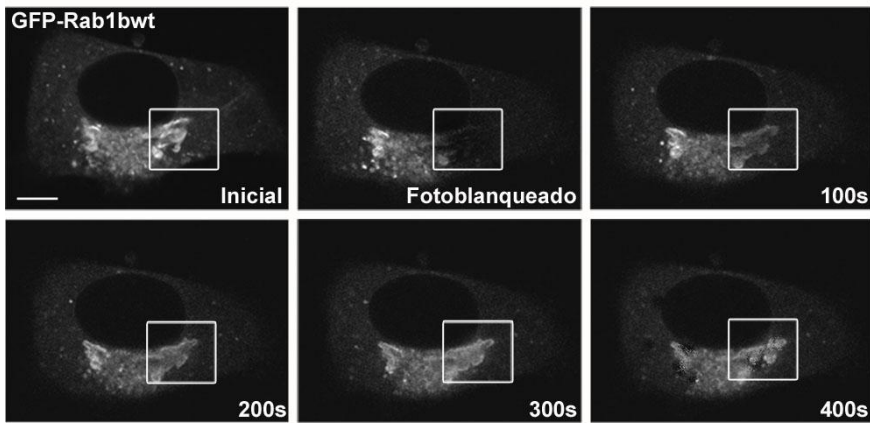
**Tabla 4. Cuantificación de los patrones dinámicos de las estructuras periféricas marcadas con GFP-Rab1, Sec13-YFP o p58-YFP**

Marcador	Células Analizadas	Estructuras Analizadas			
		Total	Inmóviles (%)	Móviles (%)	Transitorias (%)
Rab1b	7	756	23	6	71
Sec13 (COPII)	4	364	86	2	12
P58 (VTCs)	3	295	9	57	34

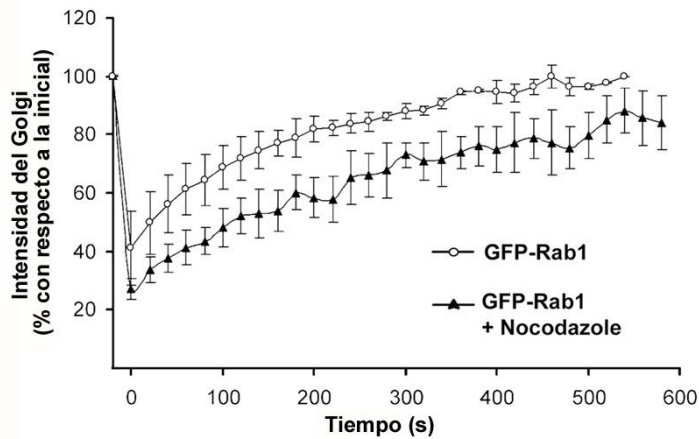
### 1.2. Dinámica de asociación de Rab1b a las membranas del complejo de Golgi

La dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las membranas del complejo de Golgi se analizó mediante la técnica de FRAP. Para ello, se transfectaron células HeLa con la construcción GFP-Rab1b, luego de 48 horas de expresión se foto-blanqueó la señal de GFP-Rab1b en un área determinada del Golgi (Figura 11 A, recuadro blanco) y se tomaron imágenes cada 20 segundos durante un tiempo total de 10 minutos. Se observó que GFP-Rab1b recuperó un 100% de la intensidad de fluorescencia inicial, presentando un  $t_{1/2}$  de 120 segundos (Figura 11 B). Este valor de  $t_{1/2}$  es comparable a los valores descriptos para otras proteínas, como  $\epsilon$ -COP y ARF1 (Presley et al., 2002; Vasudevan et al., 1998), las cuales se asocian a las membranas directamente desde el citosol, en forma independiente del transporte de intermediarios (vesículas/túbulos) mediado por microtúbulos. Para confirmar si la dinámica de asociación/disociación de GFP-Rab1b a las membranas es independiente del transporte mediado por microtúbulos se realizaron ensayos de FRAP de GFP-Rab1b en presencia de Nocodazol (agente causal de despolimerización de microtúbulos). Se observó que GFP-Rab1 recuperó un 80% de su intensidad de fluorescencia inicial en un tiempo comparable al observado anteriormente ( $t_{1/2}$  180 segundos) (Figura 11 B). Estos resultados sugieren que Rab1b se asocia mayoritariamente al complejo de Golgi mediante el reclutamiento directo de moléculas de Rab1b disponibles en el pool citosólico, en forma independiente del transporte de intermediarios mediado por microtúbulos.

A



B



### Figura 11. Cinética de asociación/disociación de Rab1b a las membranas del complejo de Golgi

Ensayo de FRAP en células HeLa transfectadas con GFP-Rab1bwt.

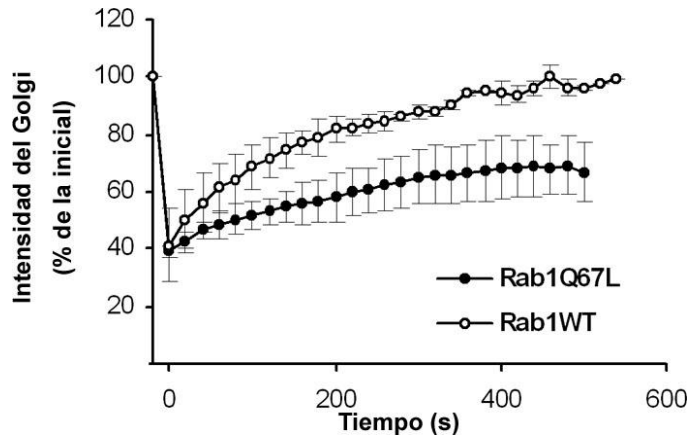
**A.** Imágenes representando el momento anterior al fotoblanqueado (Inicial), inmediatamente luego del fotoblanqueado (fotoblanqueado), y la recuperación de la fluorescencia en la región de interés (recuadro blanco) cada 100 segundos.

**B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de GFP-Rab1bwt en la región de interés en células tratadas con nocodazol (5  $\mu\text{g/ml}$ ) (triángulos negros;  $n=4$ ) o sin nocodazol (círculos vacíos;  $n=5$ ). Las barras de error representan 1 desviación estándar.

Finalmente, con el fin de evaluar si la asociación/disociación de Rab1b a las membranas del Golgi es dependiente de la capacidad de ciclado entre GTP y GDP de Rab1b, se realizaron ensayos de FRAP en células transfectadas con GFP-Rab1bQ67L (mutante con deficiente actividad GTPasa). Se observó que la fluorescencia de GFP-Rab1bQ67L se recuperó lentamente en la zona fotoblanqueada. La cuantificación de la intensidad en la región de interés mostró que sólo recuperó un 70% de la fluorescencia inicial en el tiempo total del experimento, y se observó que la forma de la curva es más aplanada que en el caso de Rab1bwt (Figura 12). Estos datos indican que la



mutante de Rab1b con deficiente actividad GTPasa presenta una dinámica de asociación más lenta que la forma salvaje (wt) y sugieren que la capacidad de Rab1b de ciclar entre las formas unidas a GDP y GTP cumple un rol importante en este proceso.



**Figura 12. Cinética de asociación/disociación de la mutante de Rab1b con deficiente actividad GTPasa a las membranas del complejo de Golgi.**

Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en la región del Golgi de GFP-Rab1bQ67L (círculos llenos; n=3) o de GFP-Rab1bwt (círculos vacíos; n=5). Las barras de error representan 1 desviación estándar.

En conjunto, el estudio de las propiedades dinámicas de Rab1b sugiere que su asociación a las membranas (tanto de ERES/VTCs como del *cis*-Golgi) es transitoria y ocurre directamente desde las reservas citosólicas de Rab1b, por un mecanismo independiente del transporte mediado por microtúbulos, en un proceso que depende en gran medida de la capacidad de ciclar entre las formas unidas a GDP y GTP.

## ***Capítulo 2***

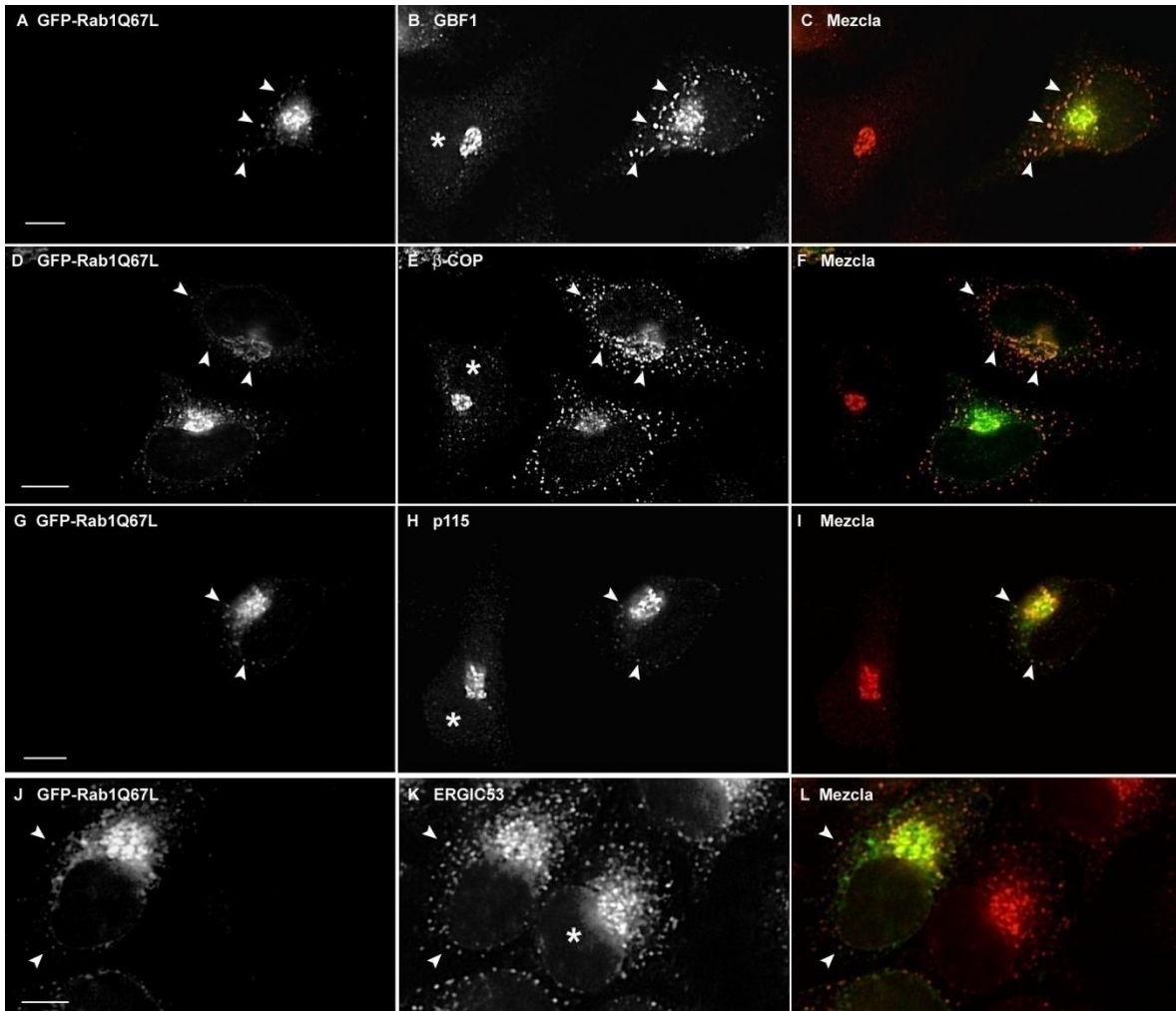
## ***Análisis de la función de Rab1b a nivel de los sitios de salida del Retículo Endoplásmico***

### **2.1. Rab1b modula la asociación de COPI a los sitios de salida del retículo endoplásmico**

El reclutamiento del complejo COPI a las membranas de los ERES/VTCs es una etapa esencial para la progresión de los intermediarios de transporte entre el RE y el complejo de Golgi (Figura 2). Las proteínas requeridas para esta etapa son, entre otras, la GTPasa Arf1 y su activador, el factor intercambiador de nucleótidos GBF1 (García-Mata et al., 2003; Niu et al., 2005). Además de Arf1 y GBF1, ha sido descrito que Rab1b también es requerida para el reclutamiento de COPI a los sitios de salida del retículo endoplásmico (Alvarez et al., 2003), sin embargo no están del todo claros los mecanismos por los cuales podría ejercer su función en esta etapa. Tal como se describió en la introducción, existen evidencias que sugieren una relación funcional entre Rab1 y GBF1 para mediar el reclutamiento de COPI.

Con el fin de evaluar el mecanismo molecular que relaciona la actividad de Rab1 con el reclutamiento de COPI se analizó, mediante ensayos de inmuno-fluorescencia, el efecto producido por la sobre-expresión de la mutante de Rab1b constitutivamente activa (Rab1bQ67L) en la localización sub-celular de proteínas involucradas en el reclutamiento de COPI. La localización de GBF1 en células no transfectadas (Figura 13 B, asterisco) coincide con los datos de publicaciones anteriores (García-Mata et al., 2003; Kawamoto et al., 2002; Niu et al., 2005), donde GBF1 se localiza en el complejo de Golgi y en un punteado periférico correspondiente a la interfase ERES/VTCs. Sin embargo, en las células transfectadas con GFP-Rab1Q67L, se observa claramente que el patrón de localización de GBF1 se encuentra alterado. La cantidad de GBF1 asociada a las estructuras periféricas se encuentra aumentada, presentando una redistribución de la señal de GBF1 desde el complejo de Golgi hacia el punteado periférico (Figura 13, A-C). Este efecto también se evidenció al observar la localización sub-celular de  $\beta$ -COP (proteína del complejo COPI), la cual también se encuentra redistribuida hacia las estructuras periféricas (Figura 13, D-F). Se destaca que tanto  $\beta$ -COP como GBF1 mostraron alta co-localización con GFP-Rab1Q67L en las estructuras periféricas (Figura 13, C y F, flechas), sugiriendo que el efecto de redistribución observado podría estar mediado por la acción de Rab1bQ67L. Para evaluar cuan específico es el

efecto observado se analizó también la localización sub-celular de un conocido efector de Rab1, p115, y de una proteína trans-membrana del compartimiento intermedio, ERGIC53.



**Figura 13. Rab1b-GTP induce redistribución de GBF1 y COPI a la interfase ERES/VTCs.**

Células HeLa transfectadas con GFP-Rab1bQ67L y analizadas por inmuno-fluorescencia 60 horas luego de la transfección. Los paneles muestran inmuno-fluorescencias para detectar GFP (A, D, G, J), GBF1 (B),  $\beta$ -COP (E), p115 (H) y ERGIC53 (K). Las flechas en cada panel indican estructuras donde se observa co-localización entre ambos marcadores. Los asteriscos indican las células no transfectadas. Las barras de tamaño indican 10  $\mu$ m.

Tanto las estructuras marcadas con p115 como con ERGIC53 presentaron co-localización con GFP-Rab1bQ67L (Figura 13, I y L, flechas), sin embargo no se observó redistribución a estructuras periféricas ni tampoco ninguna diferencia en los patrones de localización sub-celular de estos marcadores entre células transfectadas y no transfectadas (marcadas con asteriscos).

Como se describió en el capítulo anterior, la construcción constitutivamente activa de Rab1b (Rab1bQ67L) permanece mayor tiempo asociada a las membranas (Figura 12). El hecho de que el incremento en los niveles de Rab1b activa asociada a las membranas induzca un incremento específico de GBF1 y COPI en la interfase ERES/VTCs es un fuerte indicio de la existencia de una interacción entre Rab1b y GBF1 para modular el reclutamiento de COPI.

## **2.2. Rab1b modula la dinámica de asociación/disociación de Arf1 a las membranas del Golgi**

La GTPasa Arf1 cicla continuamente desde el citosol a las membranas en un proceso dependiente del intercambio de GDP por GTP (Presley et al., 2002). En la interfase RE-Golgi, se sabe que es GBF1 quien cataliza dicho intercambio de nucleótidos (Niu et al., 2005). La dinámica de asociación/disociación de Arf1 a las membranas del Golgi ha sido ampliamente estudiada. Ensayos de FRAP indican que Arf1 se asocia a las membranas directamente desde el citosol presentando tiempos de vida media cortos (menores a 60 segundos) (Presley et al., 2002; Vasudevan et al., 1998). Se ha observado también que, de manera similar a lo que ocurre con Rab1b, la mutante de Arf1 con deficiente actividad GTPasa, Arf1Q71L, permanece mayor tiempo asociada a las membranas (Presley et al., 2002). Además se ha descrito que su asociación a las membranas se ve afectada en presencia de Brefeldina A (BFA), un metabolito fúngico que inhibe la actividad de GBF1. Ensayos en células HeLa transfectadas con Arf1-GFP muestran que el agregado de BFA induce una rápida disociación de Arf1 de las membranas, sin embargo, la co-expresión de GBF1 y Arf1 inhibe la disociación de Arf1 de las membranas del Golgi inducida por BFA, posiblemente como consecuencia de la formación de un complejo estable GBF1-Arf1-BFA (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005).

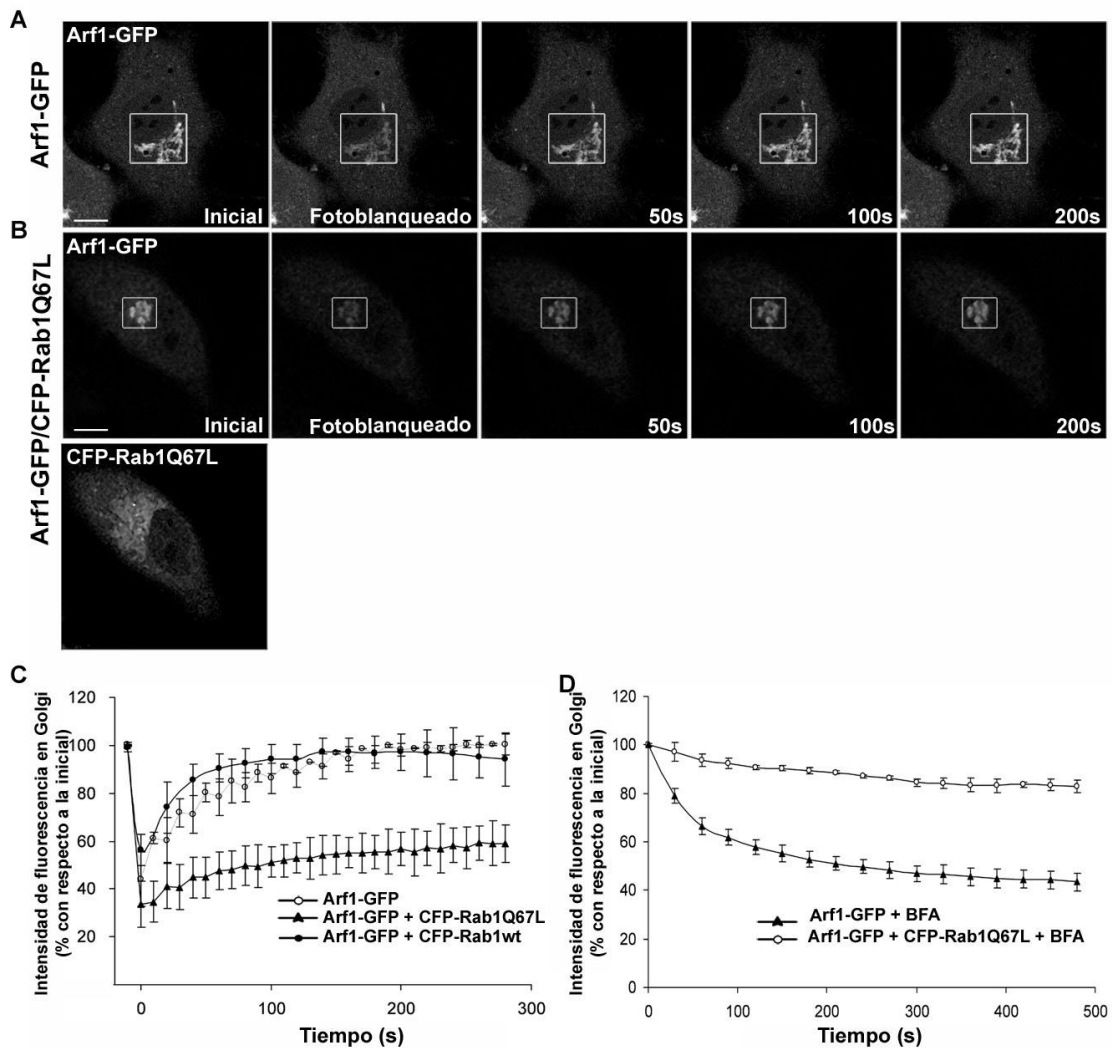
Debido a que la expresión de la mutante Rab1bQ67L incrementa la cantidad de GBF1 asociada a las membranas (Figura 13, A-C), se decidió evaluar si la dinámica del ciclo de Arf1 a las membranas es también dependiente de la actividad GTPasa de Rab1b.

Para ello se realizaron ensayos de FRAP en células HeLa transfectadas con Arf1-GFP o co-transfectadas con Arf1-GFP y CFP-Rab1bQ67L y se evaluó la dinámica de asociación/disociación de Arf1 a las membranas del Golgi. Arf1-GFP se localiza en las membranas del Golgi, en un fino punteado periférico y gran cantidad soluble en el citosol (Figura 14 A). En las células transfectadas

con Arf1-GFP el 100% de la fluorescencia inicial se recuperó en un período de tiempo corto, con un tiempo de vida media de aproximadamente 30 segundos ( $t_{1/2}$  30s) (Figura 14, A y C). El  $t_{1/2}$  obtenido fue similar al descrito previamente en la bibliografía (Presley et al., 2002; Vasudevan et al., 1998). Sin embargo en células que co-expresan Arf1-GFP y CFP-Rab1bQ67L, sólo un 55% de la fluorescencia inicial fue recuperada (Figura 14, B y C). Para discriminar si el efecto observado era causado específicamente por la expresión de Rab1bQ67L, o por el incremento de la cantidad total de Rab1b, se evaluó la dinámica de Arf1 en células co-transfectadas con Arf1-GFP y CFP-Rab1bwt. Como se muestra en la figura 14 C, la expresión de GFP-Rab1bwt no alteró la dinámica de asociación/disociación de Arf1 a las membranas del Golgi.

Estos resultados indican que la dinámica de asociación/disociación de Arf1 a las membranas del Golgi se encuentra retardada por la presencia de Rab1bQ67L, sugiriendo que el incremento de Rab1b-GTP asociada a las membranas estabiliza a Arf1 en el complejo de Golgi.

De acuerdo a nuestros resultados, la expresión de Rab1bQ67L incrementa la asociación a membranas de GBF1 (Figura 13, B), por lo tanto, debería también estabilizar la asociación a membranas de Arf1 en presencia de BFA (la cual induce disociación de Arf1) y de esta manera ejercer un efecto similar a la sobre-expresión de GBF1. Para evaluar si la expresión de Rab1bQ67L produce un efecto similar a la expresión de GBF1 se transfectaron células HeLa con Arf1-GFP o se co-transfectaron con Arf1-GFP y CFP-Rab1bQ67L, 48 horas después se trataron con BFA (5  $\mu$ g/ml), y se observó la fluorescencia de Arf1-GFP *in vivo* durante 10 minutos. En concordancia con resultados publicados (Niu et al., 2005; Presley et al., 2002), la fluorescencia en la región del Golgi de las células transfectadas con Arf1-GFP decayó a un 50% del valor inicial transcurridos 300 segundos del agregado de BFA (Figura 14, D), indicando una rápida disociación de Arf1 de las membranas. En cambio, en células co-transfectadas con Arf1-GFP y CFP-Rab1bQ67L la disminución de la fluorescencia en la región del Golgi luego del agregado de BFA fue significativamente más lenta, quedando más de un 80% de la fluorescencia inicial asociada a las membranas del Golgi transcurridos 300 segundos del experimento (Figura 14, D). Estos resultados indican que, en presencia de BFA, tanto la expresión de GBF1 como de Rab1bQ67L producen el mismo efecto en la disociación de Arf1, sugiriendo que la expresión de Rab1bQ67L induce un incremento de la cantidad de GBF1 activa, asociada a membranas, y por ende un aumento del complejo estable GBF1-Arf1-BFA asociado a las membranas.



**Figura 14. Dinámica de asociación/disociación de Arf1 a las membranas del Golgi.**

Ensayos de FRAP de Arf1 en células HeLa transfectadas con Arf1-GFP o con ARF1-GFP y CFP-Rab1bQ67L.

**A.** Ensayos de FRAP en células HeLa transfectadas con Arf1-GFP. Imágenes representando el momento anterior al fotoblanqueado (Inicial), inmediatamente luego del fotoblanqueado (fotoblanqueado), y la recuperación de la fluorescencia en la región de interés (recuadro blanco) cada 50 segundos.

**B.** Ensayos de FRAP de Arf1 en células HeLa co-transfectadas con Arf1-GFP y CFP-Rab1bQ67L. Imágenes representando el momento anterior al fotoblanqueado (Inicial), inmediatamente luego del fotoblanqueado (fotoblanqueado), y la recuperación de la fluorescencia en la región de interés (recuadro blanco) cada 50 segundos. El panel inferior muestra la fluorescencia de CFP-Rab1bQ67L.

**C.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Arf1-GFP en ensayos de FRAP de células que expresan: Arf1-GFP (círculo vacío, n=5 células); Arf1-GFP/CFP-Rab1bQ67L (triángulo negro, n=4 células); Arf1-GFP/CFP-Rab1bwt (círculo lleno, n=3 células). Las barras de error representan 1 desviación estándar.

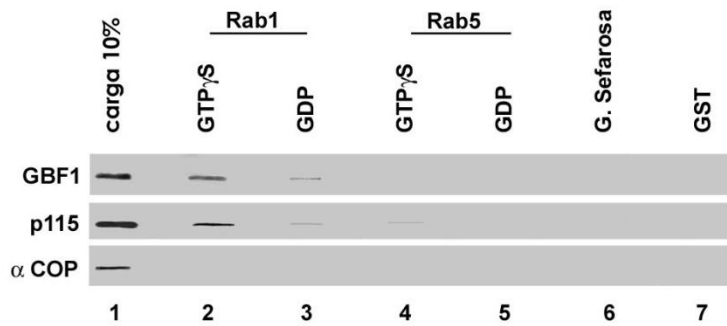
**D.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Arf1-GFP en la región del Golgi luego del tratamiento con BFA (5 µg/ml) en células que expresan Arf1-GFP (triángulos, n=7 células) o que co-expresan Arf1-GFP y CFP-Rab1bQ67L (círculos, n=5 células). Las barras de error representan 1 desviación estándar.

### **2.3. Rab1b en su forma activa interacciona directamente con GBF1**

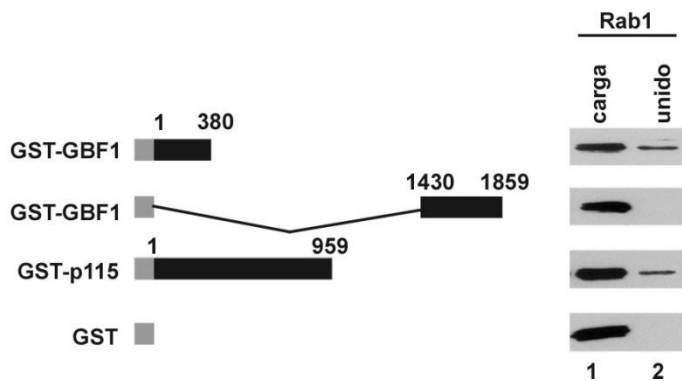
Los ensayos anteriores sugieren una relación funcional entre Rab1b, GBF1 y el reclutamiento de COPI a las membranas. Está descrito que Rab1b interacciona con p115 (Allan et al., 2000), la cual a su vez interacciona con GBF1 (Garcia-Mata and Sztul, 2003), por lo tanto la relación entre Rab1b, GBF1 y el reclutamiento de COPI podría estar mediada por un efecto directo de Rab1b sobre GBF1 o a un efecto indirecto consecuencia de su interacción con p115. A pesar de que numerosas evidencias sugieren un efecto directo de Rab1b sobre GBF1 (entre ellas el efecto inhibitorio de la expresión de Rab1bN121I en la asociación a membranas de GBF1 (Alvarez et al., 2003), o el incremento en la asociación a membranas de GBF1 pero no de p115 luego de sobre-expresar Rab1bQ67L (Figura 13 A-I), la interacción directa entre estas proteínas no ha sido descrita. En base a esto, se decidió evaluar la naturaleza de esta posible interacción. Para ello se generó una proteína de fusión con la proteína glutatión-s-transferasa (GST) fusionada al extremo N-terminal de Rab1b (GST-Rab1b) y se evaluó su capacidad para unir GBF1 presente en un lisado de citosol de hígado de rata en presencia de GTP $\gamma$ S (análogo no hidrolizable de GTP) o de GDP. Se observó que GBF1 se unió a GST-Rab1b en presencia de GTP y en menor cantidad a GST-Rab1b en presencia de GDP (Figura 15 A, carriles 2 y 3). Esta unión fue específica dado que GBF1 no se detectó unida a ninguno de los controles realizados con GST-Rab5 (GTP y GDP), GST, o glutatión-sepharosa sola (Figura 15 A, panel GBF1, carriles 4-7). Como control positivo de unión se analizó la capacidad de las distintas construcciones de unir p115 la cual es un conocido efector de Rab1 (Allan et al., 2000).



A



B



**Figura 15. GBF1 interacciona con Rab1b unida a GTP.**

**A.** Cantidades similares de GST-Rab1b y GST-Rab5 cargadas con GDP o GTP $\gamma$ S (carriles 2-5) como así también glutation-sefarosa sola (carril 6) y GST (carril 7) se incubaron con citosol de higado de rata. La figura muestra ensayos de Western blot para identificar las fracciones unidas en cada carril utilizando anticuerpos anti GBF1, p115 y  $\alpha$ -COP.

**B.** Interacción directa entre Rab1b y GBF1. Iguales cantidades de proteína Rab1b recombinante cargada con GTP $\gamma$ S se incubaron con las siguientes construcciones: (I) regiones amino (1-380) y carboxilo (1430-1859) terminal de GBF1 fusionadas a GST; (II) p115 fusionada a GST; (III) GST sola. La figura muestra ensayos de Western blot para dectectar la cantidad de Rab1b recombinante unida a cada construcción (carril 2). El carril 1 representa el 10% de la proteína Rab1b enfrentada a cada construcción.

Como se esperaba, p115 se unió preferentemente a la fracción cargada con GTP de GST-Rab1b (Figura 15 A, panel p115, carril 2). Como control de especificidad se analizó la presencia de  $\alpha$ -COP

unido las distintas construcciones, la cual sólo se detectó en el carril correspondiente a la carga total (Figura 15 A, panel  $\alpha$ -COP, carriles 1-7). En conjunto, estos resultados sugieren que GBF1 se une específicamente a Rab1b, mostrando una clara preferencia por la forma unida a GTP. Sin embargo el hecho de que Rab1b una específicamente p115 y también GBF1, no descarta la posibilidad de que la unión entre Rab1b y GBF1 sea mediada por p115 actuando como puente entre ambas moléculas.

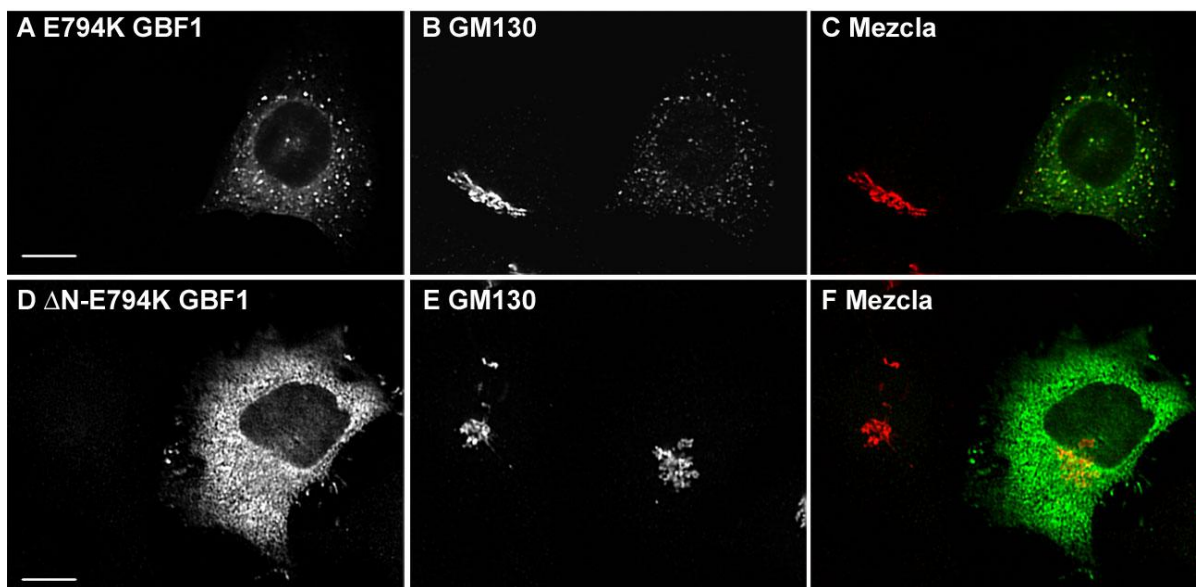
Para discriminar si Rab1b y GBF1 interaccionan directamente se realizaron ensayos de interacción *in vitro* utilizando ambas proteínas purificadas. Se utilizaron los extremos amino terminal (380 aminoácidos) y carboxilo terminal (429 aminoácidos) de GBF1 fusionados a la proteína GST, ya que por a su alto peso molecular (205 kDa) resultó imposible expresar la proteína GBF1 en forma completa. De esta manera se generaron las proteínas de fusión GST-GBF1(1-380) y GST-GBF1(1430-1859) (ver esquema en Figura 15 B), las cuales se incubaron con la proteína recombinante Rab1bwt en presencia de GTP $\gamma$ S. Paralelamente se procesaron de la misma manera las construcciones GST-p115 y GST utilizadas como controles positivo y negativo respectivamente. La unión de Rab1b a las diferentes construcciones se evaluó mediante ensayos de Western blot que indicaron que Rab1b se unió tanto a GST-p115 (control positivo) como también al dominio N-terminal de GBF1 fusionado a GST, GST-GBF1(1-380) (Figura 15 B). No se detectó presencia de Rab1b en el control negativo (GST) ni en la fracción correspondiente al dominio C-terminal de GBF1 fusionado a GST, GST-GBF1(1430-1859). Estos resultados indican que Rab1b tiene capacidad de interaccionar *in vitro* directamente con GBF1, y que el extremo N-terminal de GBF1 es requerido para dicha interacción.

#### **2.4. Funcionalidad del dominio N-terminal de GBF1**

Como se describió anteriormente GBF1 cataliza el intercambio de GDP por GTP en Arf1 (actividad GEF). Esta capacidad catalítica reside en un dominio denominado SEC7 que se encuentra altamente conservado desde levaduras a mamíferos (Cherfils and Melancon, 2005). Se ha descrito que la mutación puntual E794K en este dominio interfiere con su actividad GEF, generando una proteína inactiva que mantiene su capacidad de asociarse a membranas comportándose como una mutante dominante negativa (Garcia-Mata et al., 2003). La expresión en células HeLa de GFP-GBF1E794K causa disociación de COPI de las membranas y fragmentación

del complejo de Golgi con un patrón similar al producido por BFA, donde las proteínas del Golgi se redistribuyen al RE y a un punteado periférico (Figura 16 A-C) (Garcia-Mata et al., 2003).

Con el fin de analizar la funcionalidad de la unión entre Rab1b y el extremo N-terminal de GBF1 se evaluó si la mutante de GBF1-E794K requiere el extremo N-terminal, y por ende la interacción con Rab1b, para actuar como dominante negativa. Para ello se generó una construcción de GBF1-E794K sin los primeros 294 aminoácidos del extremo N-terminal ( $\Delta$ N-GBF1-E794K) y se transfectaron células HeLa para observar el efecto ejercido sobre el complejo de Golgi. Notablemente, a diferencia de GBF1-E794K, la mutante truncada sin el dominio N-terminal no se asoció a membranas y no tuvo ningún efecto significativo sobre la estructura del complejo de Golgi (Figura 16, D-F). Estos resultados indican que la mutante E794K requiere el dominio N-terminal (el cual es necesario para la interacción con Rab1b) para asociarse a membranas y actuar como dominante negativa, sugiriendo que el dominio N-terminal de GBF1, y por consiguiente la interacción con Rab1b, cumpliría un rol importante para la asociación a membranas y la función de GBF1.



**Figura 16. Funcionalidad del dominio N-terminal de GBF1.**

Evaluación del rol del dominio N-terminal de GBF1 mediante utilización de la construcción dominante negativa E794K que induce fragmentación de Golgi.

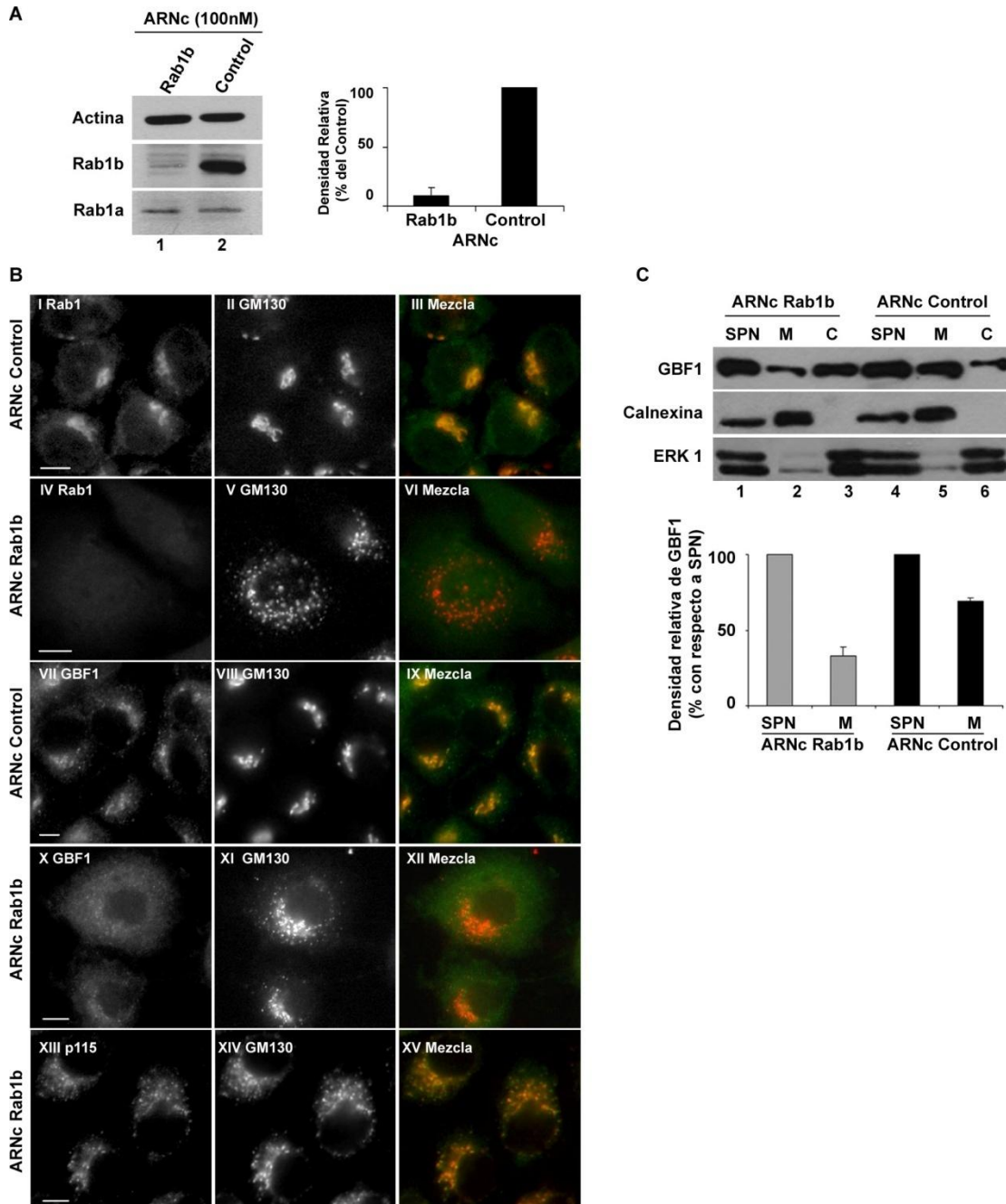
**A-C.** Células HeLa transfectadas con la construcción E794K-myc. La construcción se asocia a las membranas (**A**) e induce fragmentación del Golgi en las células transfectadas (**B**). Las barras de tamaño representan 10  $\mu$ m.

**D-F.** Células HeLa transfectadas con la construcción E794K truncada, sin el dominio N-terminal ( $\Delta$ N-E794K-myc). La construcción no tiene capacidad para asociarse a las membranas (**D**) y no ejerce ningún efecto en la fragmentación del Golgi (**E**). Las barras de tamaño representan 10  $\mu$ m.

## 2.5. Rab1b es necesaria para la asociación de GBF1 a las membranas

GBF1 cicla continuamente del citosol a las membranas (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005). Debido a que no posee ninguna modificación post-traducciona que le confiera capacidad de unión a membranas, se ha propuesto que este proceso se llevaría a cabo mediante la interacción con otras proteínas que la recluten específicamente (Kawamoto et al., 2002).

Los resultados presentados anteriormente indican que Rab1b y GBF1 se encuentran funcionalmente relacionadas e interaccionan directamente entre sí, además se evidenció que para su asociación a membranas GBF1 requiere el dominio N-terminal, mediante el cual interacciona con Rab1b. Estos datos sugieren que la asociación a membranas de GBF1 podría estar mediada por su interacción directa con Rab1b. Con el fin de analizar esta posibilidad se evaluó la localización sub-celular de GBF1 en ausencia de Rab1b. Para ello se establecieron condiciones de silenciamiento específico de la expresión de Rab1b en células HeLa mediante la técnica de ARN de interferencia (ARNi). Se transfectaron las células con ARN cortos (ARNc) específicos para Rab1b, luego de 72 horas se realizaron ensayos de Western blot para evaluar el nivel endógeno de Rab1b remanente luego del tratamiento (Figura 17 A). En paralelo se procesaron de igual manera células transfectadas con ARNc “scrambled” (control) que fueron utilizadas como control de especificidad. Los niveles endógenos de Rab1b presente en las células tratadas con ARNc específicos para Rab1b fueron considerablemente menores a los observados en las células tratadas con ARNc control (panel Rab1b, carriles 1 y 2), sin embargo, los niveles de actina, utilizada como control de carga, no se modificaron (Figura 17 A, panel Actina). Además, los niveles de la isoforma “a” de Rab1, Rab1a, que comparte más de un 90% de homología en su secuencia con Rab1b, tampoco se modificaron por el tratamiento con ARNc-Rab1b (Figura 17 A, panel Rab1a) indicando que el silenciamiento de los niveles endógenos de Rab1b es altamente específico. La cuantificación de las señales detectadas en los ensayos de Western blot indica que la densidad relativa de la señal de Rab1b respecto a la señal de actina se redujo aproximadamente un 90% en las células transfectadas con ARNc específicos para Rab1b (Figura 17 A, gráfico de barras).



**Figura 17. Silenciamiento de los niveles endógenos de Rab1b.**

**A.** Ensayos de Western blot para evaluar los niveles de Rab1b, Rab1a y actina (utilizada como control de carga) en células HeLa tratadas con ARN cortos específicos par Rab1b (carril 1) o ARN cortos control (carril 2). El gráfico de barras muestra la densidad relativa de la señal de Rab1b respecto a la señal de Actina en cada carril (N=3). El valor obtenido en el control representa el 100 %. La barra de error representa una desviación estándar.

**B.** Ensayos de IF en células HeLa transfectadas con ARNc-Rab1b y ARNc-control utilizando los anticuerpos indicados en la parte superior de cada panel. Las barras de tamaño representan 10  $\mu$ m.

**C.** Fraccionamiento subcelular de células HeLa transfectadas con ARNc específicos para Rab1b o ARNc control. Las fracciones obtenidas: sobrenadante post-nuclear (SPN), membranas (M) y citosol (C), se sometieron a ensayos de Western blot para evaluar la proporción de GBF1 en cada una. Como controles se utilizó ERK1 (control citosólico) y Calnexina (membranas). El grafico de barras muestra la densidad relativa de GBF1 con respecto a Calnexina en las fracciones M y SPN (N=2). El valor obtenido en SPN representa el 100%. Las barras de error indican 1 desviación estándar.

El efecto del silenciamiento de la expresión endógena de Rab1b sobre GBF1 y otros marcadores del complejo de Golgi se analizó por microscopía de fluorescencia empleando anticuerpos anti-GBF1, anti-GM130 y anti-p115. En células tratadas con el ARNc-control Rab1b presentó un patrón normal, concentrada en la región yuxtanclear y en un punteado periférico (Figura 17 B, I). GM130 también se observó concentrada en la región yuxta-nuclear, presentando co-localización con Rab1b (Figura 17 B, II y III). GBF1 mostró un patrón normal, localizada en estructuras periféricas y en el complejo de Golgi (Figura 17 B, VII-IX).

En las células transfectadas con ARN cortos específicos para Rab1b, la señal de Rab1b fue casi indetectable, observándose muy débil y difusa (Figura 17 B, IV). La inhibición de la expresión de Rab1b indujo una importante fragmentación del complejo de Golgi, GM130 se redistribuyó en pequeñas estructuras en la periferia celular (Figura 17 B, V), en un patrón similar al observado luego del tratamiento con BFA, o la sobre-expresión de la mutante dominante negativa de Rab1b (Alvarez et al., 2003). También se observó un cambio importante en la localización sub-celular de GBF1 en las células transfectadas con ARNc-Rab1b. En lugar del punteado periférico característico de la señal de GBF1, se observó una señal difusa, con escaso porcentaje de co-localización con GM130 (Figura 17B, X-XII), indicando que en ausencia de Rab1b, GBF1 se redistribuyó al citosol. Estos datos sugieren que Rab1b es necesaria para la asociación a membranas de GBF1. A pesar de la notable redistribución de GBF1 al citosol se observó un pequeño punteado que indica que una proporción de GBF1 aún se encuentra asociada a membranas. Esto puede ser debido al 10% de Rab1b endógena remanente en las células luego del tratamiento con ARN cortos específicos (Figura 17 A, panel Rab1b, carril 1) o a la acción la isoforma Rab1a, la cual no es afectada luego del tratamiento (Figura 17 A, panel Rab1a, carril 1).

Como se mencionó anteriormente, la relación funcional entre Rab1b y GBF1 podría estar mediada por la acción de la proteína p115, la cual tiene capacidad de interactuar tanto con GBF1 como con Rab1b (Allan et al., 2000; Garcia-Mata and Sztul, 2003). Además, se ha descrito que la asociación de p115 a las membranas de los sitios de salida del retículo endoplásmico es dependiente de la acción de Rab1 (Allan et al., 2000), por lo tanto podría ser p115 y no Rab1 la encargada de reclutar a GBF1 a las membranas, siendo la disociación de GBF1 observada luego del silenciamiento de Rab1b, una consecuencia de la disociación de p115. En base a estos datos, se evaluó si la disociación de GBF1 de las membranas observada luego del silenciamiento de Rab1b se correlaciona con la disociación de p115. Para ello se observó la localización sub-celular de p115 luego del tratamiento de células HeLa con ARNc-Rab1b. Como se muestra en la figura 17 B

(paneles XIII-XV), p115 se mantuvo asociada a las membranas de las estructuras periféricas y del complejo de Golgi (donde co-localiza con GM130). Estos datos sugieren que el requerimiento de Rab1b para la asociación a membranas de GBF1 es específico, e independiente de la acción de p115.

Finalmente, y con el objetivo de evaluar qué cantidad de GBF1 permanece asociada a las membranas luego del silenciamiento de Rab1b, se realizaron ensayos de fraccionamiento subcelular de células tratadas con ARNc-Rab1b o ARNc-control. Se analizaron las fracciones correspondientes a sobrenadante post-nuclear (SPN), citosol (C) y membranas (M). Como marcador de la fracción de membranas se utilizó Calnexina (proteína integral de membranas del RE) y como marcador de citosol se utilizó ERK-1 (Figura 17 C). Luego del fraccionamiento se realizaron ensayos de Western blot para evaluar la cantidad de GBF1 en las distintas fracciones. Para evaluar la cantidad de GBF1 en cada fracción se determinó la densidad relativa de la señal de GBF1 con respecto a Calnexina en las fracciones correspondientes a sobrenadante post-nuclear y membranas tanto en células tratadas con ARNc específicos para Rab1b como en células control. El valor obtenido en las fracciones de SPN se fijó como 100% y el obtenido en las fracciones de membrana se referenció al mismo. Se observó que en células tratadas con ARNc-control un 70% del total de GBF1 se encuentra en la fracción correspondiente a membranas, mientras que en células tratadas con ARNc específicos para Rab1b solo un 30% de GBF1 se encuentra en dicha fracción. Estos resultados refuerzan los datos obtenidos por inmuno-fluorescencias permitiéndonos afirmar que Rab1b es necesaria para la asociación a membranas de GBF1 y, consecuentemente, para el reclutamiento de COPI.

## ***Capítulo 3***



## ***Evaluación de la relación entre la función de Rab1b y la estructura del complejo de Golgi***

Los resultados que conforman este capítulo fueron obtenidos en el marco de un proyecto de colaboración con la Dra. María Antonietta De Matteis. Los ensayos presentados fueron realizados durante los meses de Septiembre a Diciembre de 2007 en el Departamento de Biología Celular y Oncología del Consorzio Mario Negri Sud, situado en Santa María Imbaro, provincia de Chieti, Italia.

El complejo de Golgi se localiza en la zona próxima al centro organizador de microtúbulos y la envoltura nuclear. Está constituido por un conjunto de cisternas aplanadas, una red de estructuras túbulo-vesiculares y pequeñas vesículas a su alrededor. Las cisternas, clasificadas en *cis*, *medial* y *trans*, poseen diferencias en su composición proteica y contienen enzimas necesarias para la modificación post-traducciona de las proteínas de transporte (Altan-Bonnet et al., 2004). Más allá de su compleja estructura el complejo de Golgi es una organela altamente dinámica, su forma y tamaño se adecuan a los diferentes requerimientos celulares. Durante la división celular se fragmenta completamente en pequeños compartimientos que son destinados en partes iguales a las dos células hijas para luego ensamblarse y formar un nuevo complejo de Golgi de características similares al original (Lowe et al., 1998; Lucocq et al., 1989; Shorter and Warren, 2002). También experimenta cambios morfológicos en relación al incremento o disminución de la demanda de transporte. Cuando el transporte se encuentra disminuido el complejo de Golgi pierde complejidad observándose como un apilamiento de cisternas sin estructuras túbulo-vesiculares a su alrededor, en cambio, ante un incremento en el flujo de transporte aumenta su complejidad y con ella la cantidad de vesículas y/o túbulos en su periferia (Marra et al., 2007). Si bien las causas que modulan los cambios morfológicos ocurridos en el complejo de Golgi han sido objeto de numerosos estudios, los mecanismos que gobiernan estos cambios y que mantienen la estructura y la identidad del Golgi no están completamente comprendidos.

Existe un grupo de proteínas cuya función está directamente relacionada al mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi, las principales son las pertenecientes a la familia de las Golgins (GM130, Golgin-84, Giantin, Golgin-97, etc.) y a la familia de las Arf GTPasas (Derby et al., 2007; Marra et al., 2007; Xiang et al., 2007).

Hay evidencias suficientes que sugieren que Rab1b podría ser también una proteína clave en el mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi: **a)** Luego de los ensayos de silenciamiento de Rab1b el complejo de Golgi se observa fragmentado (Figura 17 B, V). **b)** Proteínas involucradas en el mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi como GM130, Giantin y Golgin84 son conocidos efectores de Rab1 (Beard et al., 2005; Moyer et al., 2001; Satoh et al., 2003; Weide et al., 2001). **c)** Ensayos recientes realizados en células de músculo cardíaco humano indican que Rab1 se encuentra involucrada en vías de señalización (mediadas por MAPK quinasas) que llevan a un incremento del tamaño celular, sugiriendo que la actividad de Rab1 puede disparar un incremento general de membranas en estas células (Wu, 2008). **d)** Finalmente, ensayos realizados en nuestro laboratorio indican que cambios en los niveles de Rab1 inducen cambios en la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en el mantenimiento de la estructura del Golgi. En conjunto estos datos sugieren que existe una estrecha relación entre la función de Rab1 y el mantenimiento de la estructura del Golgi.

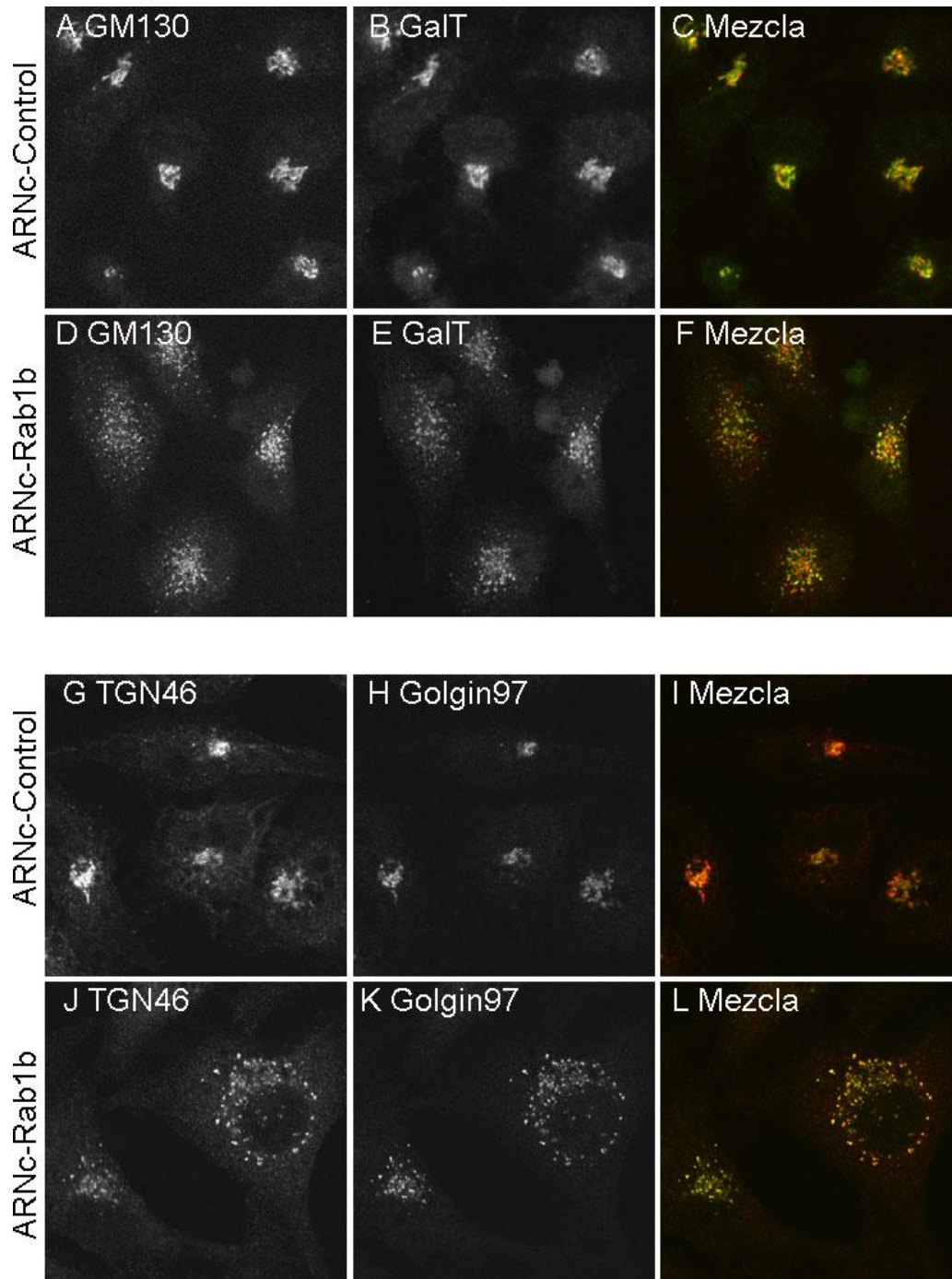
Con el propósito de evaluar con mayor detalle la relación entre la función de Rab1 y la estructura del complejo de Golgi, se realizó un análisis global de la estructura del complejo de Golgi en el contexto de “activación” e “inactivación” de Rab1. La “activación” de Rab1 se realizó mediante expresión en células HeLa de la construcción Rab1bwt o Rab1bQ67L fusionadas al epítipo GFP. La “inactivación” de Rab1 se realizó mediante silenciamiento de los niveles de Rab1b endógena mediante la técnica de ARN de interferencia, utilizando ARN cortos específicos para Rab1b. Estas metodologías para “activar” o “inactivar” la función de Rab1 fueron combinadas con técnicas de microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica para evaluar a nivel ultra-estructural el complejo de Golgi y la interfase retículo endoplásmico/Golgi. A continuación se describen los resultados obtenidos en cada condición.

### **3.1. Análisis estructural del complejo de Golgi en el contexto de inactivación de Rab1b**

La expresión endógena de Rab1b en células HeLa se silenció mediante el uso de ARN cortos específicos para Rab1b, tal cual fue descrito en el capítulo 2.

Como primer paso para analizar el efecto del silenciamiento de Rab1b sobre la estructura del complejo de Golgi, se realizaron ensayos de microscopía confocal para analizar la localización subcelular de marcadores de *cis*-Golgi (GM130) y *trans*-Golgi (GalT, TGN46 y Golgin97). La microscopía

de fluorescencia confocal presenta mayor resolución que la microscopía de epi-fluorescencia debido a que la información que compone la imagen proviene únicamente de una fina sección inferior a 1  $\mu\text{m}$  de espesor, de esta manera el patrón de localización sub-celular observado es más preciso. En concordancia con lo descrito previamente (Figura 17 B), empleando microscopía de epi-fluorescencia, el fenotipo de GM130 en células tratadas con ARNc específicos para Rab1b fue totalmente diferente al observado en células tratadas con ARNc control. GM130, se observó asociada a pequeñas estructuras distribuidas en la periferia celular en un gran porcentaje de las células silenciadas con ARNc específicos para Rab1b (Figura 18 D). En forma semejante, los marcadores de *trans*-Golgi utilizados, GalT, TGN46 y Golgin97, también se detectaron asociadas a estructuras en la periferia celular (Figura 18 E, J, K). En conjunto, el hecho de que proteínas correspondientes a las cisternas *cis* y *trans* del complejo de Golgi pierdan su localización normal y sean observadas asociadas a pequeñas estructuras dispersas en la periferia celular sugiere que el silenciamiento de los niveles endógenos de Rab1b induce fragmentación de las cisternas *cis* y *trans* del complejo de Golgi. Resulta interesante destacar que, aunque GalT y GM130 fueron redistribuidos a pequeñas estructuras dispersas en la periferia celular, no presentaron co-localización (Figura 18 F) indicando que más allá de la fragmentación experimentada luego del silenciamiento de los niveles endógenos de Rab1b, los compartimientos *cis* y *trans* del complejo de Golgi mantuvieron su identidad.

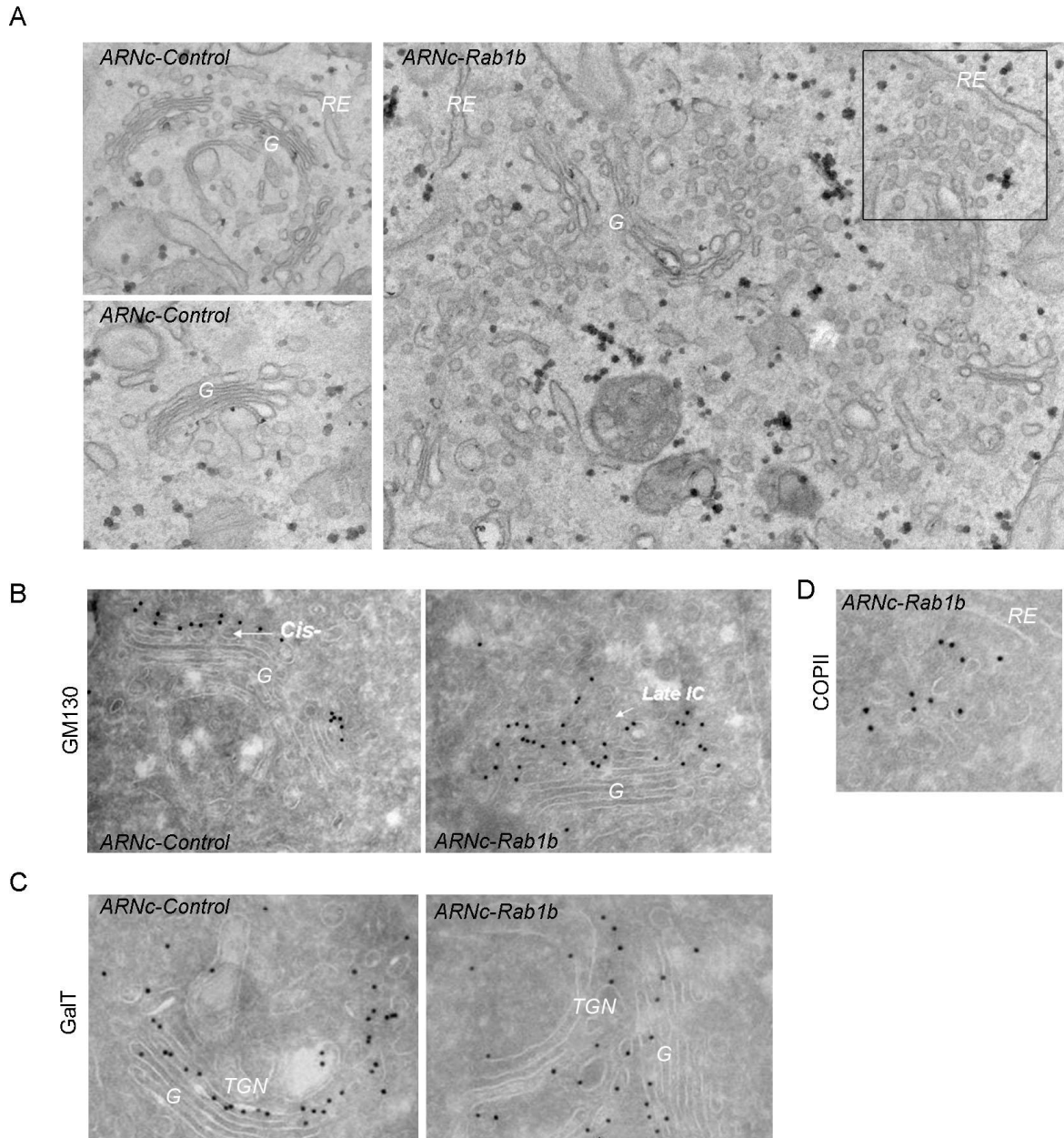


**Figura 18. Estructura del Golgi en células tratadas con ARNc específicos para Rab1b.**

Imágenes de microscopía confocal utilizando marcadores de Golgi en células HeLa tratadas con ARN cortos específicos para Rab1b o ARN cortos control. Se utilizaron anticuerpos anti-GM130 como marcador de *cis*-Golgi (A, D) y anti-GalT (B, E), anti-Golgin97 (H, K) y TGN46 (G, J) como marcadores de *trans*-Golgi.

Para analizar a nivel ultra-estructural el efecto producido en el complejo de Golgi por el silenciamiento de Rab1b, se realizaron ensayos de microscopía electrónica (ME) en células tratadas con ARNc control o con ARNc específicos para Rab1b. En las células tratadas con ARNc control se observó que el complejo de Golgi presentó patrón normal como un grupo de cisternas aplanadas y alineadas, rodeadas de vesículas (Figura 19 A, ARNc-control). En cambio, en las células con niveles silenciados de Rab1b, el Golgi se encontró fragmentado y desorganizado, solo se observaron algunas cisternas remanentes aisladas. Con el fin de clarificar el fenotipo de fragmentación del Golgi observado y de conocer la identidad de las cisternas fragmentadas se realizaron ensayos de cryo-ME empleando anticuerpos anti-GM130 (*cis*-Golgi) (Figura 19 B) y anti-GaT (*trans*-Golgi) (Figura 19 C). En células control GM130 y GaT se detectaron en los compartimientos *cis* y *trans* del complejo de Golgi respectivamente. En cambio, y en concordancia con los ensayos de inmuno-fluorescencia, en células con niveles de Rab1b silenciados, GM130 y GaT perdieron su localización original y se encontraron asociadas a pequeñas estructuras redondeadas, indicando que las cisternas *cis* y *trans* del Golgi se fragmentaron.

Además de la fragmentación de las cisternas *cis* y *trans* del Golgi, en las células silenciadas se observó también un gran incremento del número de estructuras redondeadas próximas a los sitios de salida del RE (Figura 19 A, ARNc-Rab1b, recuadro). Ensayos de cryo-ME utilizando el anticuerpo anti-Sec31 (marcador de estructuras COPII) indicaron que la mayoría de estas estructuras fueron positivas para Sec31, sugiriendo que la población incrementada de estructuras corresponde a estructuras recubiertas con COPII (Figura 19 D).



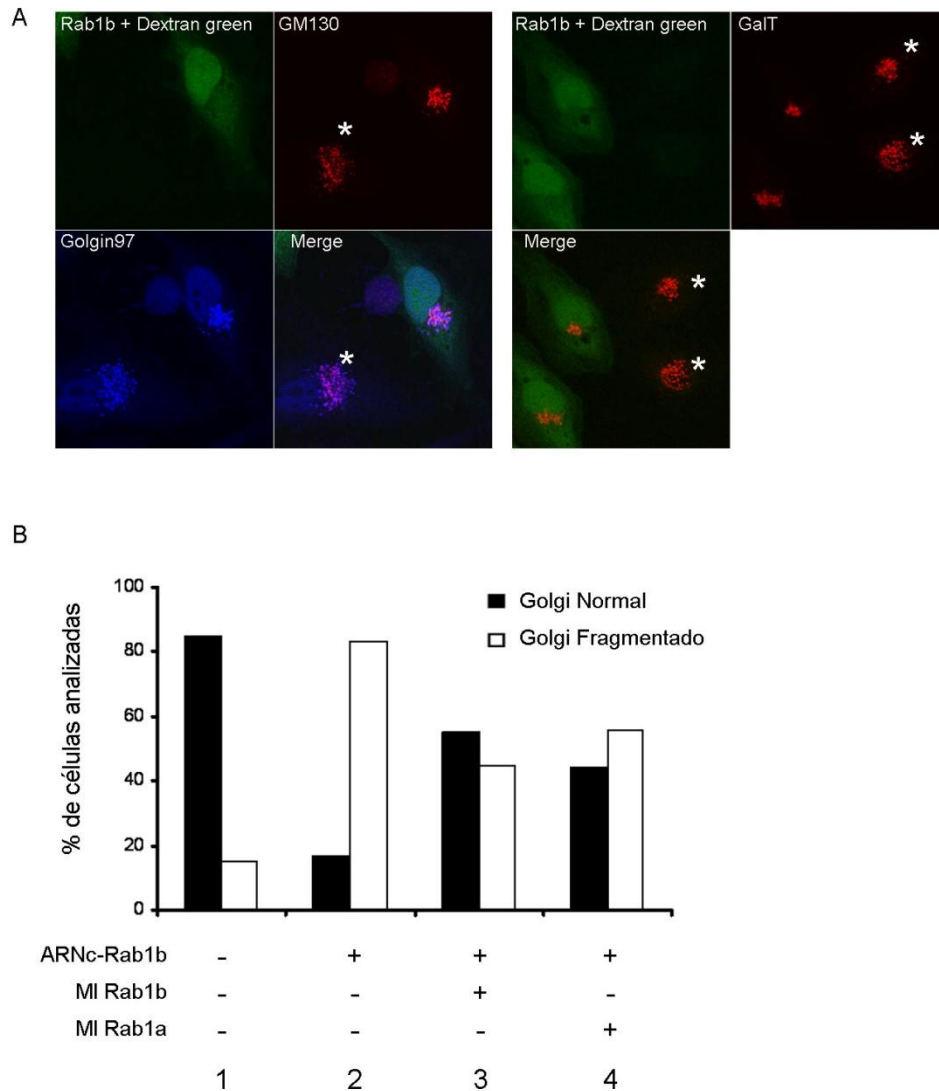
**Figura 19. Ultra-estructura del complejo de Golgi en células tratadas con ARN cortos específicos para Rab1b.**

**A.** Ensayos de microscopía electrónica realizados en células HeLa para evaluar el complejo de Golgi (G) y los sitios del salida del retículo endoplásmico (RE).

**B-D.** Ensayos de cryo-microscopía electrónica marcados con anticuerpos anti-GM130 (**B**), GalT (**C**) y COPII (**D**).

### 3.1.2. Requerimiento de Rab1b para el mantenimiento de la estructura del Golgi

Con el propósito de analizar el requerimiento de Rab1b para el mantenimiento de la estructura normal del complejo de Golgi se evaluó si la fragmentación del Golgi causada por el silenciamiento de Rab1b podía ser recuperada luego del agregado de Rab1b pura en forma exógena. Para ello se transfectaron células HeLa con ARN cortos específicos para Rab1b, luego de 72 horas de la transfección se micro-inyectaron aproximadamente 40 células con la proteína Rab1b recombinante (diluida en dextran-green para su posterior identificación) y se incubaron durante 4 horas a 37°C. Las células se fijaron y se realizaron ensayos de inmuno-fluorescencia con distintos marcadores del Golgi (GM130, Golgin97 y GalT) para comparar el patrón del Golgi entre células micro-inyectadas y no micro-inyectadas. Se observó que la micro-inyección de Rab1b recombinante revirtió la fragmentación del Golgi causada por el silenciamiento de la expresión de Rab1b endógena. Los tres marcadores de Golgi utilizados presentaron una localización normal en las células micro-inyectadas (marcadas con dextran-green), mientras que en las células no micro-inyectadas (marcadas con asteriscos) el Golgi se observó completamente fragmentado (Figura 20 A). Para analizar cuantitativamente el fenómeno observado se calculó el porcentaje de células con patrón de GM130 fragmentado y normal en las diferentes condiciones ensayadas (Figura 20 B). Se determinó que en las células sin tratamiento alguno un 15% presentaron un patrón de GM130 fragmentado (probablemente corresponden a células en división), mientras que el 85% restante presentaron un patrón de GM130 normal (Figura 20 B, condición 1). En las células tratadas solamente con ARN cortos específicos para Rab1b un 83% presentaron un patrón de GM130 fragmentado, encontrándose sólo un 17% con patrón normal (Figura 20 B, condición 2). En las células tratadas con ARN cortos específicos para Rab1b que posteriormente fueron micro-inyectadas con Rab1b recombinante, un 55% presentaron patrón de GM130 normal, y sólo un 45% presentaron patrón de Golgi fragmentado (Figura 20 B, condición 3), indicando que un porcentaje considerable de las células con Golgi fragmentado recuperaron su patrón normal luego del agregado de Rab1b recombinante. Estos datos sugieren que el restablecimiento de los niveles de Rab1b es suficiente para que el complejo de Golgi recupere su estructura normal y que existe un requerimiento funcional específico de Rab1b para el re-ensamblado del complejo de Golgi.



**Figura 20. Efecto de la micro-inyección de Rab1 recombinante en células con expresión de Rab1b silenciada.**

Células HeLa tratadas con ARN cortos específicos para Rab1b por 72 horas que fueron luego micro-inyectadas con Rab1 (a o b) recombinante purificada.

**A.** Imágenes de inmuno-fluorescencias mostrando el patrón de distintos marcadores de Golgi (GM130, Golgin97 y GaIT) en células micro-inyectadas con Rab1b (dextran green) y en células no micro-inyectadas (marcadas con asteriscos).

**B.** Porcentaje de células con patrón de GM130 fragmentado (barras blancas) o normal (barras negras) en las distintas condiciones evaluadas. Condición 1: células sin tratar. Condición 2: Células tratadas con ARNc-Rab1b. Condición 3: Células tratadas con ARNc-Rab1b y luego micro-inyectadas con Rab1b. Condición 4: Células tratadas con ARNc-Rab1b y luego micro-inyectadas con Rab1a.

Con el propósito de evaluar si las dos isoformas de Rab1, Rab1a y Rab1b, tienen funciones intercambiables en relación al mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi, se realizaron



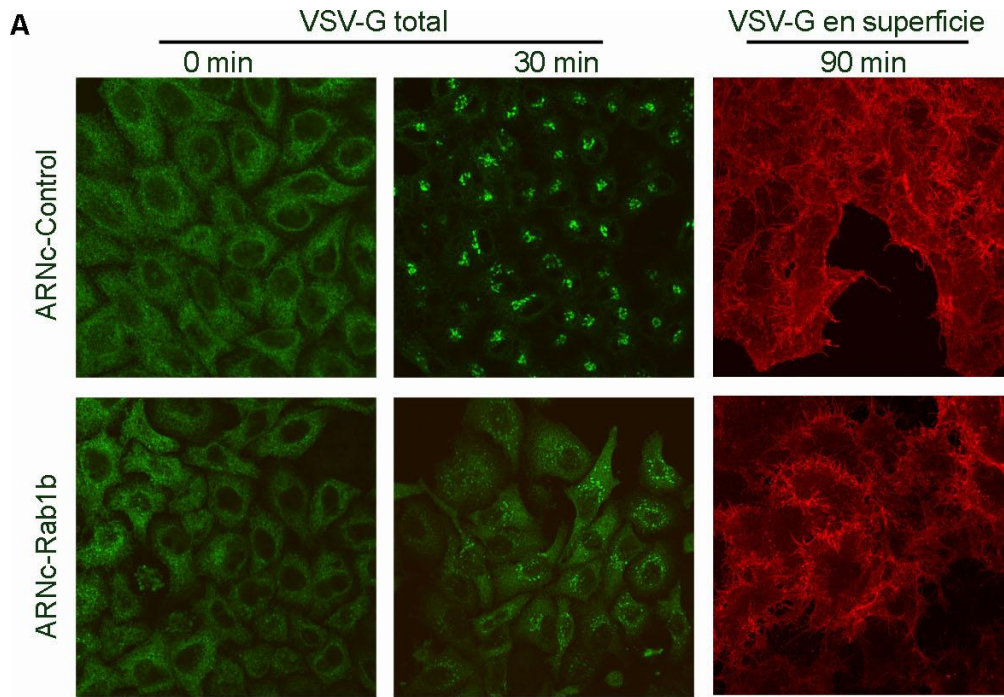
ensayos de micro-inyección de Rab1a en células tratadas con ARN cortos específicos para Rab1b. Sorprendentemente la fragmentación de GM130 fue revertida en un 45% de las células micro-inyectadas (Figura 20 B, condición 4) indicando que el incremento en los niveles de Rab1a pudo reemplazar funcionalmente la falta de Rab1b endógena producida por el tratamiento con ARN cortos. Estos resultados indican que ambas isoformas poseen actividades intercambiables, sin embargo no excluyen la posibilidad de que a niveles endógenos Rab1a y Rab1b cumplan diferentes roles.

### **3.1.3. Análisis de transporte en células con expresión de Rab1b silenciada**

El análisis de transporte de la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSV-G, por *Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein*) es una metodología ampliamente utilizada en biología celular para estudiar el transporte intracelular de proteínas. La existencia de una mutante termo sensible de ésta proteína (*tsVSV-G*) permite que su transporte pueda ser controlado y sincronizado mediante cambios en la temperatura de incubación de las células. La proteína VSV-G puede ser expresada en la célula mediante transfección con un plásmido, o simplemente mediante infección realizada por exposición del cultivo celular a una dilución conteniendo el virus. Cuando las células son incubadas a 40°C la mutante termo sensible de la proteína VSV-G no se pliega correctamente produciéndose su acumulación en el RE. El cambio de la temperatura de incubación de las células de 40°C a 32°C permite el correcto plegamiento de esta proteína y el transporte de la misma desde el RE al resto de la vía secretoria. Luego de 30 minutos a 32°C VSV-G se localiza en el complejo de Golgi y a los 90 minutos en membrana plasmática. Con el fin de estudiar si los cambios estructurales observados en el complejo de Golgi luego del silenciamiento de los niveles de Rab1b tienen algún efecto en la funcionalidad del transporte intracelular de proteínas se analizó el transporte de VSV-G en células con niveles de Rab1b silenciados. Para ello se transfectaron células HeLa con ARN cortos específicos para Rab1b, luego de 72 horas de la transfección se realizó la infección con el virus de estomatitis vesicular y se incubaron las células a 40°C para inducir la acumulación de VSV-G en el retículo endoplásmico. Luego de 2 horas de incubación a 40°C, las células se transfirieron a 32°C. El monitoreo del transporte de VSV-G se realizó mediante ensayos de inmuno-fluorescencia a tiempos de 0, 30 y 90 minutos de incubación a 32°C.

En células tratadas con ARNc-control VSV-G presentó inicialmente patrón reticular (Figura 21 A, 0 min), luego de 30 minutos a 32°C prácticamente toda la señal se localizó en el Golgi y a los 90 minutos alcanzó la membrana plasmática (Figura 21 A). En células con niveles de Rab1b silenciados, el transporte de VSVG presentó una dinámica similar, con una mayor cantidad de VSV-G retenida en el RE a los 30 minutos de incubación a 32°C. A pesar de la retención en el RE, la marca de VSV-G superficial luego de 90 minutos de incubación a 32°C indica que en células con baja expresión de Rab1b, VSV-G puede alcanzar la membrana plasmática (Figura 21 A, VSV-G en superficie) y que el transporte de VSV-G está enlentecido más que inhibido.

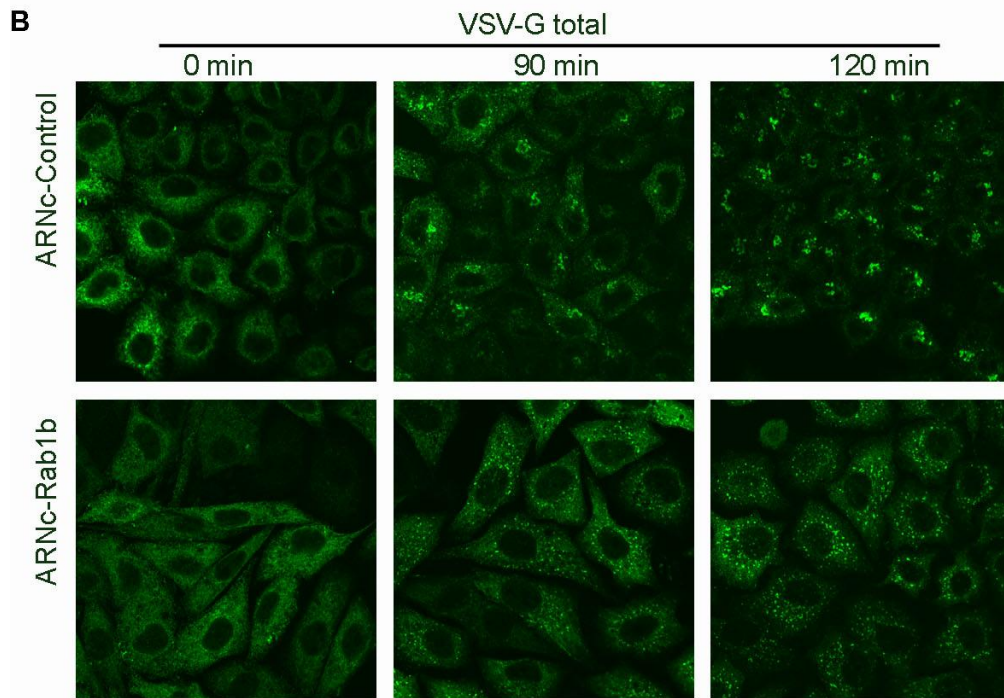
Con el fin de evaluar con mayor precisión si existe una diferencia en la cinética del transporte de VSV-G entre células control y silenciadas se realizó un nuevo ensayo donde el transporte se monitoreó a 20°C en lugar de 32°C. A esta temperatura el transporte ocurre con mayor lentitud y se encuentra limitado entre RE y Golgi, de esta manera es más simple evidenciar si existe alguna diferencia en el transporte de VSV-G a este nivel. Se trataron células HeLa con ARNc control o ARNc específicos para Rab1b y luego de 72 horas de incubación se infectaron con el virus de stomatitis vesicular. Luego se incubaron durante 2 horas a 40°C para inducir la acumulación de VSV-G en el retículo endoplásmico y posteriormente se transfirieron a 20°C. El transporte de VSV-G se analizó mediante IF transcurridos 90 y 120 minutos de incubación a 20°C. Se observó que luego de 90 min VSV-G alcanzó el Golgi en células tratadas tanto con ARNc-control como con ARNc-Rab1b, sin embargo, en células con expresión de Rab1b silenciada nuevamente se observó una importante retención de VSV-G en el RE a este tiempo (Figura 21 B). Esta retención en el RE fue aún más notoria luego de 120 minutos a 20°C. Con el fin de evaluar la cantidad de VSV-G retenida en el RE se cuantificó la intensidad de la señal reticular con respecto a la intensidad de la señal total en cada una de las imágenes obtenidas luego de 120 minutos de incubación a 20°C. Para ello, utilizando el programa ImageJ, se discriminó la señal reticular de la señal correspondiente al Golgi o a las estructuras punteadas presentes en las células silenciadas. Luego se cuantificó la intensidad de la señal reticular con respecto a la señal total en las distintas condiciones. Se observó que la relación VSV-G reticular/VSV-G total es aproximadamente el doble (180%) en las células tratadas con ARN cortos específicos para Rab1b con respecto a las tratadas con ARN cortos control (Figura 21 C), indicando que el transporte de VSV-G entre RE y Golgi se encuentra disminuido, pero no bloqueado en ausencia de Rab1b.



**Figura 21. Ensayo funcional de transporte de VSV-G.**

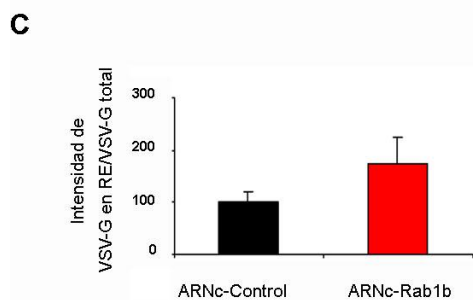
Células HeLa tratadas con ARN cortos específicos para Rab1b o ARN cortos control infectadas con el virus de estomatitis vesicular.

**A.** Transporte de VSV-G realizado a 32°C y monitoreado a los tiempos indicados en la parte superior de cada panel. La figura muestra inmuno-fluorescencias de marca total de VSV-G a tiempos de 0 y 30 minutos, o de marca superficial de VSV-G a 90 minutos.



**B.** Transporte de VSV-G realizado a 20°C y monitoreado a los tiempos indicados en la parte superior de cada panel. La figura muestra inmuno-fluorescencias de marca total de VSV-G a tiempos de 0, 90 y 120 minutos.

**C.** Cuantificación de la señal de VSV-G en el RE con respecto a la señal total luego de 120 minutos de incubación a 20°C en células tratadas con ARNc-Rab1b (barras rojas) o con ARNc-control (barras negras). Las barras de error representan 1 desviación estándar.



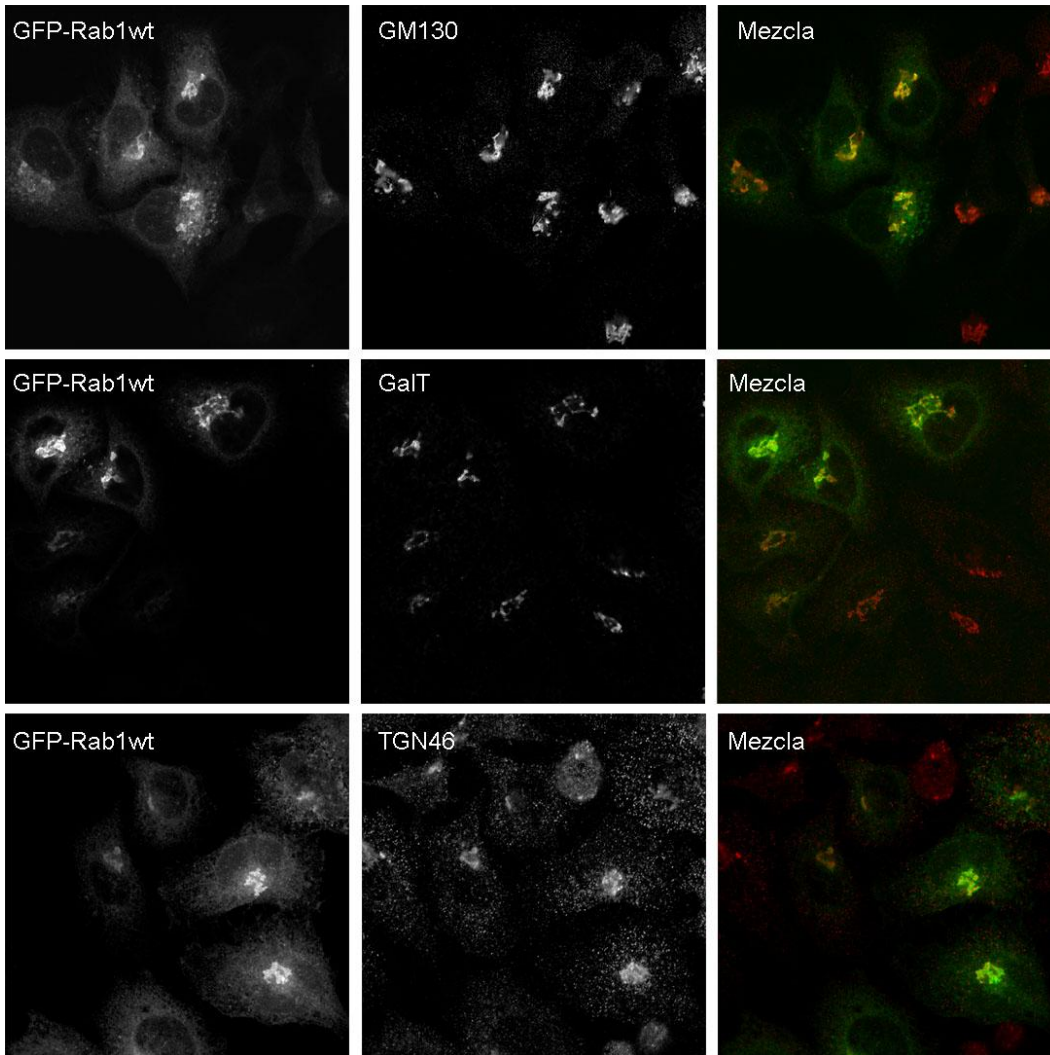
En conjunto, estos resultados indican que en ausencia de Rab1b el transporte de proteínas entre el RE y el Golgi se encuentra levemente retardado y la estructura del complejo de Golgi es considerablemente afectada, sugiriendo que el mantenimiento de la estructura del Golgi es más sensible a los cambios de los niveles de Rab1b que el transporte de VSV-G.

### **3.2. Análisis estructural del complejo de Golgi en el contexto de activación de Rab1b**

Con el fin de evaluar el efecto de la activación de Rab1b en la estructura del complejo de Golgi se realizaron ensayos de microscopía confocal para evaluar la localización sub-celular de GM130 (como marcador de *cis*-Golgi), GalT y TGN46 (como marcadores de *trans*-Golgi ) en células que sobre-expresan la construcción GFP-Rab1wt o la mutante constitutivamente activa (Rab1bQ67L). Luego, se evaluaron a nivel ultra-estructural los cambios observados mediante la técnica de CLEM (Correlative Light Electron Microscopy), la cual permite realizar ensayos de microscopía electrónica en células individuales transfectadas e identificadas por microscopía de fluorescencia.

#### **3.2.1. Efecto de la sobre-expresión de Rab1bwt en la estructura del Golgi**

Los ensayos de inmuno-fluorescencia realizados previamente indican que la sobre-expresión de Rab1bwt no ejerce ningún efecto significativo en la localización sub-celular de COPI ni de GBF1 (Figura 9), ni altera la dinámica de asociación a membranas de Arf1 (Figura 14). Sin embargo, la evaluación por microscopía confocal del patrón sub-celular de distintos marcadores de Golgi reveló que GM130, GalT y TGN46 presentan un patrón normal pero considerablemente más intenso en las células transfectadas con GFP-Rab1bwt con respecto a las no transfectadas (Figura 22). Debido a que GM130 es un conocido efector de Rab1b, su incremento podría deberse a un mayor reclutamiento causado por mayor cantidad de Rab1b asociada a las membranas, pero teniendo en cuenta que tanto GalT como TGN46 son proteínas trans-membrana y ninguna interacciona directamente con Rab1b, el incremento observado podría ser consecuencia de un efecto general de agrandamiento del complejo de Golgi.

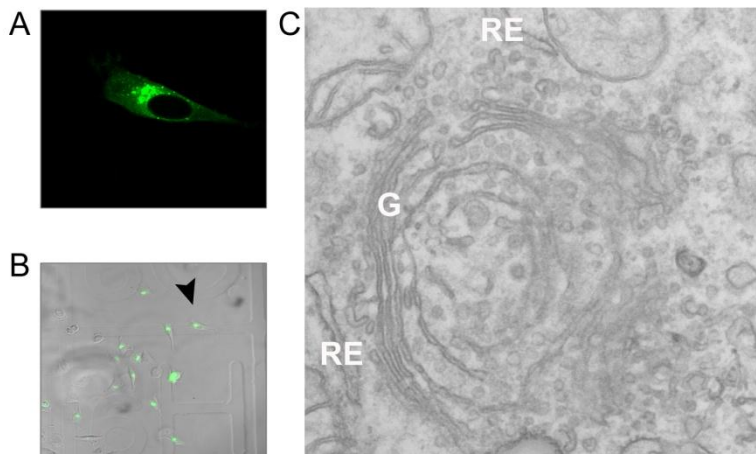


**Figura 22. Estructura del Golgi en células que sobre-expresan Rab1bwt**

Ensayos de inmuno-fluorescencia utilizando distintos marcadores de Golgi en células HeLa transfectadas con GFP-Rab1bwt. Se utilizaron anticuerpos anti-GM130 como marcador de cis-Golgi, y anti-GalT y anti-TGN46 como marcadores de trans-Golgi.

Para analizar ultra-estructuralmente el efecto producido por la sobre-expresión de Rab1wt se realizaron ensayos de CLEM. Para ello se crecieron células HeLa en placas con fondo de vidrio, se transfectaron con la construcción GFP-Rab1bwt y luego de 72 horas se identificaron *in vivo* mediante microscopía de fluorescencia (Figura 23 A) y de contraste de fase (Figura 23 B, flecha). Posteriormente se fijaron las células y se procesaron para microscopía electrónica. Se observó que la expresión de Rab1bwt produjo un incremento en el tamaño del Golgi sin afectar su fenotipo normal (Figura 23). Análisis cualitativos indicaron que las cisternas *cis*, *medial* y *trans* se

encontraron bien definidas y alineadas pero el largo de las mismas se incrementó. Además se observó un aumento en el número de estructuras de menor tamaño (vesículas y túbulos) en las proximidades del Golgi y a nivel de los sitios de salida del RE. Estos resultados, si bien necesitan ser confirmados por análisis cuantitativos, concuerdan con lo observado mediante inmunofluorescencias y sugieren que el aumento en los niveles de Rab1b es capaz de generar un incremento global del tamaño del complejo de Golgi.

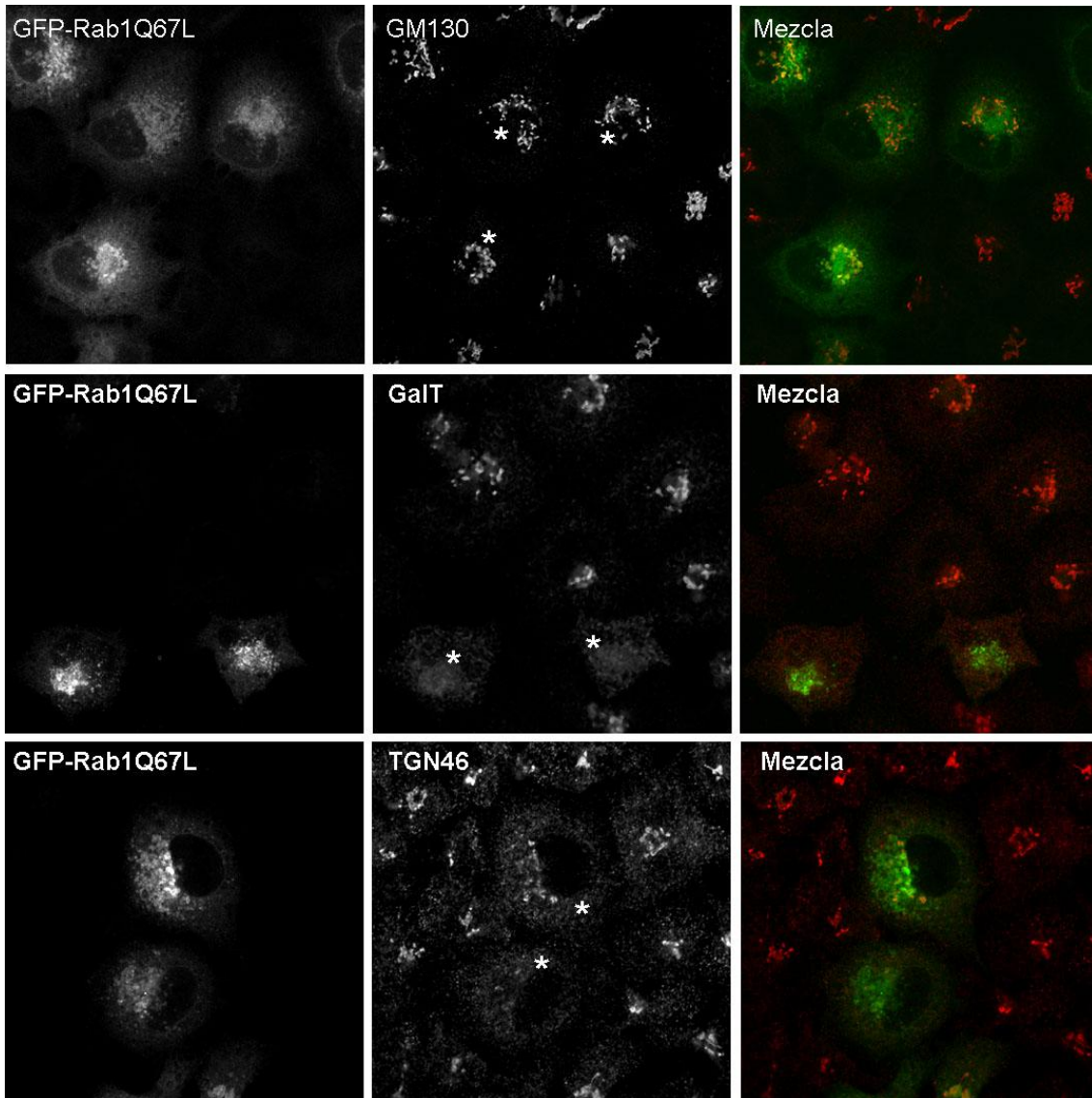


**Figura 23. Análisis ultra-estructural del complejo de Golgi en células que sobre-expresan Rab1bwt.**

Ensayos de Correlative-Light-Electorn-Microscopy (CLEM) de células transfectadas con GFP-Rab1bwt para evaluar a nivel ultra-estructural el complejo de Golgi y la interfase RE/Golgi. **A.** Identificación de la célula transfectada con GFP-Rab1bwt por fluorescencia directa. **B.** Localización de la célula de interés en placa con fondo de vidrio. **C.** Microscopía electrónica de la región del Golgi de la célula seleccionada.

### 3.2.2 Efecto de la expresión de Rab1bQ67L en la estructura del Golgi

Como se describió anteriormente, la expresión de la mutante Rab1bQ67L en células HeLa causa diferentes fenotipos: incrementa la cantidad de GBF1 y COPI asociados a los sitios de salida del retículo endoplásmico y estabiliza a Arf1 en las membranas del Golgi (Figuras 13 y 14). Para evidenciar el efecto de la expresión de la mutante de Rab1b constitutivamente activa sobre la estructura del Golgi se realizaron ensayos de inmunofluorescencias en células HeLa transfectadas con la construcción GFP-Rab1bQ67L. Posteriormente, mediante microscopía confocal, se evaluaron los patrones de localización sub-celular de marcadores de *cis*-Golgi (GM130) y *trans*-Golgi (GalT, TGN46).



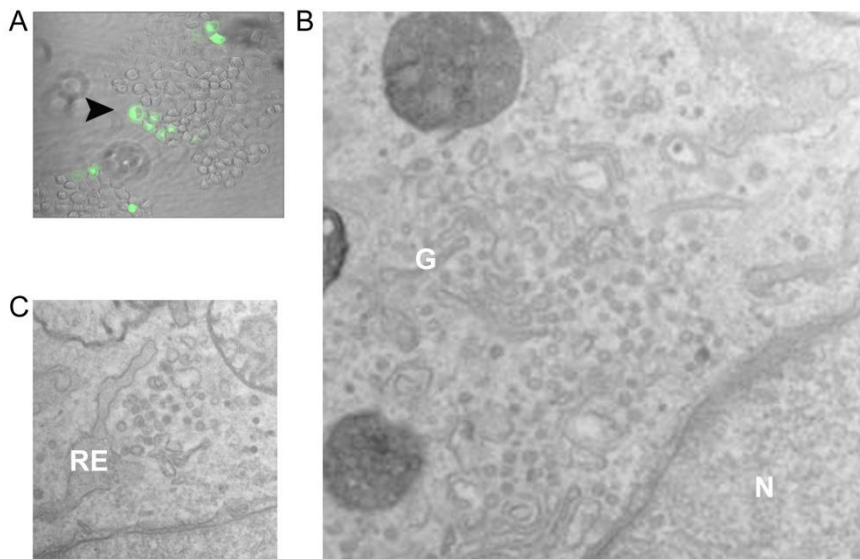
**Figura 24. Estructura del Golgi en células que sobre-expresan Rab1bQ67L.**

Ensayos de inmuno-fluorescencia utilizando distintos marcadores de Golgi en células HeLa transfectadas con GFP-Rab1bQ67L. Se utilizaron anticuerpos anti-GM130 como marcador de *cis*-Golgi, y anti-GalT y anti-TGN46 como marcadores de *trans*-Golgi.

Se observó que las células transfectadas presentaron fenotipos de Golgi diferentes al de las células no transfectadas. Un gran porcentaje de las mismas presentaron fragmentación del *cis*-Golgi marcado con GM130. Resulta importante destacar que la fragmentación observada difiere de aquella producida luego del silenciamiento de Rab1b donde GM130 se observaba asociada a pequeñas estructuras en la periferia celular. En este caso la fragmentación fue central, con GM130 asociada a estructuras concentradas en la región yuxta-nuclear (Figura 24, panel GM130,

asteriscos). Aún más importantes fueron las diferencias obtenidas con los marcadores de *trans*-Golgi (GalT y TGN46) donde se observó una fragmentación total y en algunos casos una redistribución a un patrón reticular (Figura 24, paneles GalT y TGN46, asteriscos).

Para evaluar este fenotipo a nivel ultra-estructural se realizaron ensayos de CLEM en células transfectadas con GFP-Rab1Q67L. Se observó que la expresión de esta mutante indujo una completa fragmentación del complejo de Golgi, quedando remanentes sólo algunas cisternas aisladas rodeadas de un gran número de vesículas de tamaño y forma homogénea (que de acuerdo a su tamaño y densidad pueden catalogarse como recubiertas con COPI) (Figura 25 B). Notablemente, el número de vesículas en la interfase ERES/VTCs también se encontró considerablemente aumentado (Figura 25 C). Estos resultados concuerdan con los descriptos previamente donde se observa que la expresión de la mutante activa de Rab1 induce una redistribución y aumento de COPI asociado a los ERES (Figura 13).



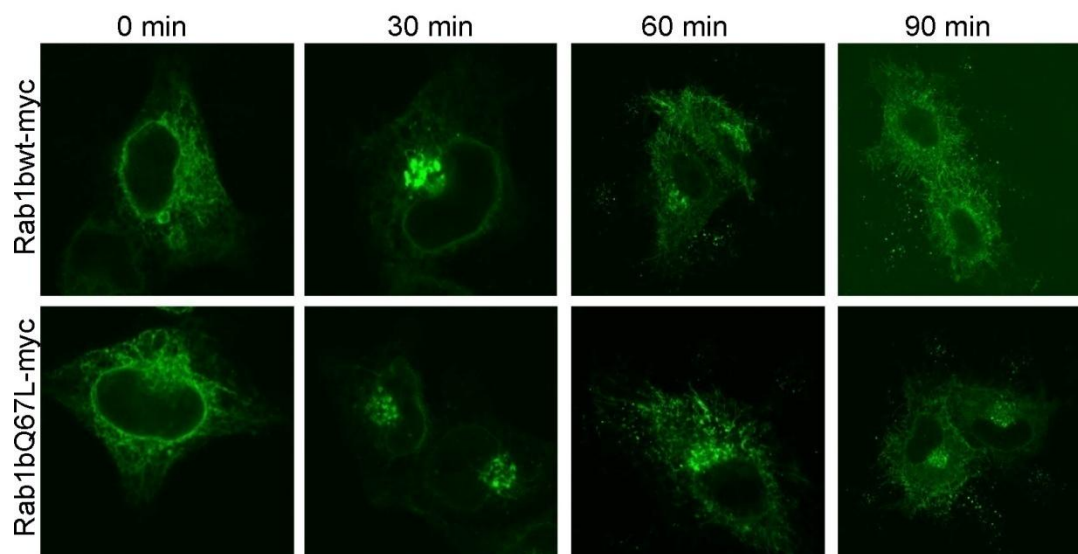
**Figura 25. Análisis ultra-estructural del complejo de Golgi en células que sobre-expresan Rab1bQ67L.**

Ensayos de Correlative-Light-Electorn-Microscopy (CLEM) de células transfectadas con GFP-Rab1bQ67L. **A.** Combinación de fluorescencia y contraste de fase para localizar la célula de interés (flecha). **B.** Microscopía electrónica de la región yuxta-nuclear de la célula seleccionada donde se observa un gran número de vesículas en lugar del complejo de Golgi. **C.** Microscopía electrónica de los sitios de salida del RE en la célula seleccionada.



### 3.2.3. Análisis funcional de transporte en células con expresión de Rab1bwt y Rab1bQ67L

Con el fin de estudiar si los cambios estructurales del complejo de Golgi observados al incrementar la actividad de Rab1 tienen algún efecto en la funcionalidad del transporte intracelular de proteínas, se realizaron ensayos de transporte de VSV-G en células transfectadas con la construcción Rab1bwt o Rab1bQ67L. Inesperadamente las células transfectadas resultaron resistentes a la infección con el virus de *stomatitis vesicular* y la expresión de VSV-G en ellas fue indetectable. Debido a este inconveniente se implementó un protocolo alternativo. Se co-transfectaron células HeLa con VSV-G-GFP y las construcciones Rab1bwt o Rab1bQ67L fusionadas al epítipo myc. Transcurridas 40 horas desde la transfección las células se incubaron a 40°C durante 12 horas para inducir la acumulación de VSV-G-GFP en el Golgi, luego se incubaron a 32°C para permitir el transporte hacia el Golgi y la membrana plasmática. El monitoreo del transporte de VSV-G se llevó a cabo mediante IF realizadas a tiempos de 0, 30, 60 y 90 minutos posteriores a la incubación a 32°C.

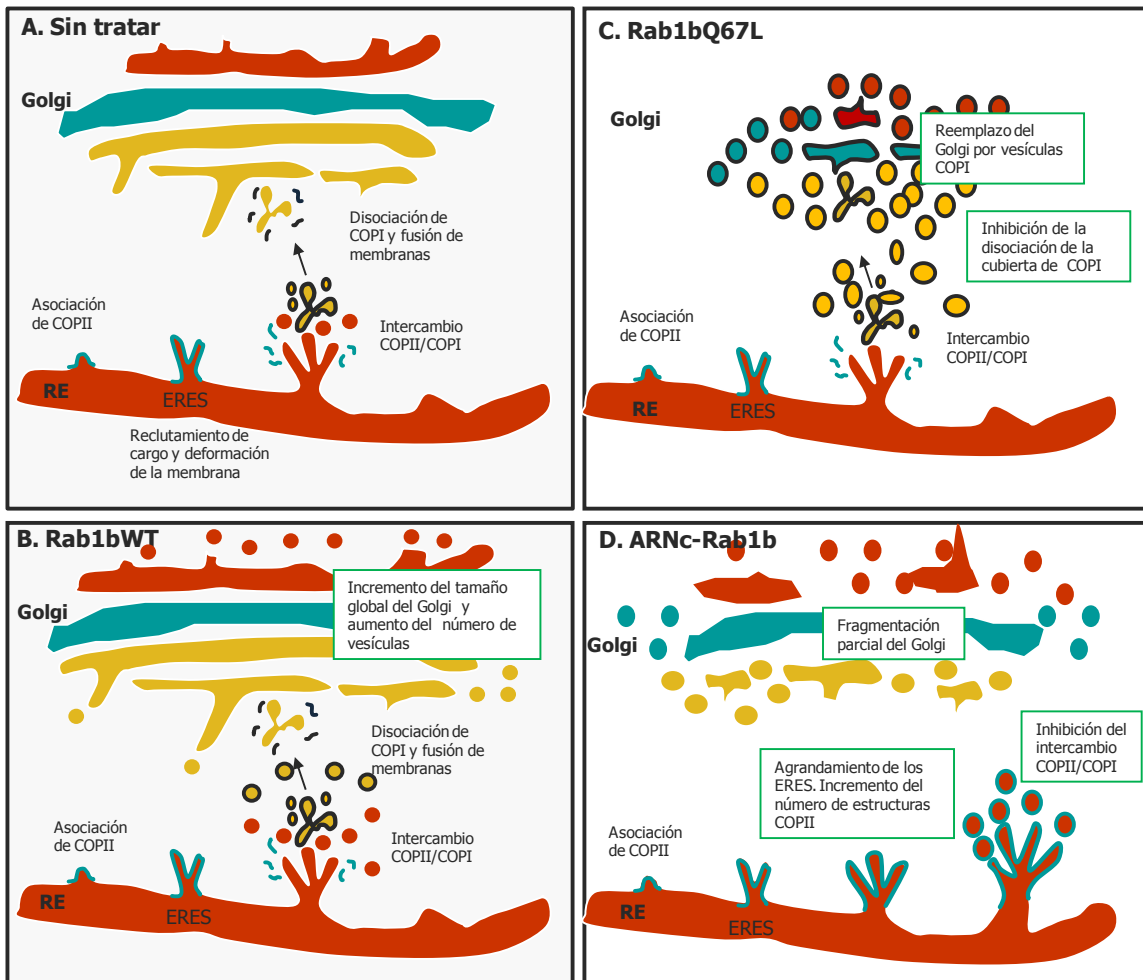


**Figura 27. Ensayo de transporte de VSV-G en células transfectadas con Rab1bwt o Rab1bQ67L**

Células HeLa transfectadas co-transfectadas con VSV-G-GFP y las construcciones de Rab1b (wt y Q67L) fusionadas al epítipo myc. El transporte de VSV-G se realizó a 32°C y se monitoreó a los tiempos indicados en la parte superior de cada panel. La figura muestra imágenes de inmunofluorescencias realizadas para evaluar la marca total de VSV-G a tiempos de 0, 30, 60 y 90 minutos.

En células co-transfectadas con VSV-G-GFP y Rab1wt el transporte de VSV-G se comportó de manera similar a las células transfectadas únicamente con VSV-G-GFP. La señal de VSV-G-GFP se encontró en el Golgi luego de 30 minutos, en Golgi y membrana plasmática a los 60 minutos y luego de 90 minutos la señal se encontró principalmente en la membrana plasmática (Figura 27). En células co-transfectadas con VSV-G-GFP y la mutante constitutivamente activa de Rab1b (Rab1bQ67L), VSV-G alcanzó la membrana plasmática, sin embargo aún luego de transcurridos 90 minutos de incubación a 32°C, una fuerte señal de VSV-G-GFP se observó en el complejo de Golgi, indicando una retención a este nivel (Figura 27). Teniendo en cuenta que los datos de los análisis ultra-estructurales indican que en estas células el complejo de Golgi se encuentra fragmentado en pequeñas vesículas recubiertas por COPI, existe la posibilidad de que mayor estabilidad de la asociación de la cubierta de COPI impida la fusión de estas vesículas y la consiguiente formación de las cisternas del complejo de Golgi.

Los resultados del análisis ultra-estructural del complejo de Golgi y de la interfase RE-Golgi en condiciones de inhibición o activación de Rab1b se encuentran simplificados y diagramados en el esquema de la figura 28. En el sector superior derecho de cada panel se indica la condición evaluada. Los recuadros verdes indican las características más destacadas observadas en cada condición.



**Figura 28.** Esquemas representando las características ultra-estructurales más destacadas observadas en la interfase RE-Golgi y en el complejo de Golgi en células HeLa sin tratamiento alguno (A), transfectadas con Rab1bwt (B), transfectadas con Rab1bQ67L (C) o tratadas con ARN cortos específicos para Rab1b.

En conjunto, tanto los datos obtenidos del análisis de la estructura del Golgi como de la funcionalidad del transporte luego de activar o inactivar Rab1b, sugieren que el mantenimiento de la estructura del Golgi es más sensible a los cambios en los niveles de Rab1b que el transporte intracelular de proteínas.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizaron distintos aspectos relacionados al rol de la GTPasa Rab1b en la regulación del transporte intracelular de proteínas entre el Retículo Endoplásmico y el complejo de Golgi.

La proteína Rab1 en células de mamíferos fue caracterizada en el año 1990 (Chavrier et al., 1990), desde entonces, se han realizado un gran número de ensayos orientados a dilucidar el rol de esta GTPasa en el transporte intracelular de proteínas. Al momento de comenzar con este trabajo de tesis solamente se conocían dos proteínas con capacidad de interaccionar directamente con Rab1, ellas eran p115 (Allan et al., 2000) y GM130 (Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001). Debido a que ambas son proteínas relacionadas a procesos de fusión de los intermediarios de transporte provenientes del RE con las membranas del *cis*-Golgi, por mucho tiempo se relacionó a Rab1, únicamente con esta etapa. Posteriormente se describió que Rab1 no sólo se encontraba involucrada en etapas de fusión de intermediarios de transporte, sino que también era requerida en una etapa previa necesaria para la maduración de dichos intermediarios, el reclutamiento de COPI, indicando un nuevo rol funcional de Rab1 en la regulación del transporte intracelular (Alvarez et al., 2003).

Luego, en forma paralela al desarrollo de el presente trabajo de tesis, se atribuyeron nuevas funciones a Rab1 en base a la descripción de nuevos efectores. En orden cronológico se describió la interacción entre Rab1 y una proteína estructural del complejo de Golgi, Golgin-84 (Satoh et al., 2003), y dos proteínas citosólicas, MICAL-1 que interacciona con filamentos intermedios del citoesqueleto (Weide et al., 2003), e Iporin que estaría involucrada en vías de señalización (Bayer et al., 2005). La descripción de estos nuevos efectores, posicionó a Rab1 como una proteína clave para el transporte entre RE y Golgi, regulando diversas etapas tales como el mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi, el anclado de membranas al cito-esqueleto y a la participación en vías de señalización.

Específicamente en el presente trabajo de tesis, se evaluó: 1) El comportamiento dinámico de Rab1b; 2) El mecanismo por el cual Rab1 modula el reclutamiento de COPI; y 3) La relación entre Rab1 y la estructura del complejo de Golgi. Los resultados obtenidos en cada campo fueron descriptos en los correspondientes capítulos, a continuación se encuentra una breve discusión de los puntos más significativos.

### **GBF1, una nueva proteína efectora de Rab1**

GBF1 es una proteína de asociación periférica que continuamente cicla desde el citosol a las membranas (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005). Una vez en las membranas, cataliza el intercambio de GDP por GTP en Arf1 promoviendo el reclutamiento del complejo COPI, para luego liberarse de las membranas y permanecer en el citosol. Si bien se conoce bastante acerca de su dinámica y su función, aún no están del todo claros los mecanismos mediante los cuales GBF1 logra asociarse a las membranas. Debido a que en su secuencia no posee ninguna región consenso de unión a membranas, ni se ha descrito el agregado post-traduccionale de grupos hidrofóbicos que le permitan su asociación a las mismas, se ha propuesto que su unión a las membranas no debe ser directa, sino probablemente mediada por proteínas que actúen como receptores específicos de GBF1 en las membranas. Los resultados presentados muestran que Rab1b interacciona directamente con el dominio amino terminal de GBF1 (Figura 15) y que su silenciamiento induce una significativa disociación de GBF1 de las membranas (Figura 17). Además se observó que la construcción de GBF1 con deficiente actividad GEF, requiere el dominio amino terminal y por consiguiente la interacción con Rab1, para asociarse a las membranas y actuar como dominante negativa (Figura 16). En este sentido, datos previamente publicados indican que la expresión de la mutante dominante negativa de Rab1b (Rab1bN121I) también induce una marcada disociación de GBF1 de las membranas (Alvarez et al., 2003). En conjunto, estos resultados sumados a datos publicados indican que Rab1b es requerida para la asociación a membranas de GBF1, promoviendo de esta manera el reclutamiento de COPI y la formación de intermediarios de transporte. Algunos autores proponen que no se trataría de una acción directa de Rab1b sobre GBF1, sino que sería mediada por la acción de la proteína p115 (Altan-Bonnet et al., 2004). Sin embargo, en ensayos realizados por otros autores se muestra que una construcción de GBF1 truncada, sin el dominio de interacción con p115, es capaz de asociarse a las membranas, indicando que GBF1 no requiere la interacción con p115 para localizarse (García-Mata and Sztul, 2003). En concordancia, los resultados descritos en el capítulo 2 muestran que luego del silenciamiento de Rab1b, p115 se mantuvo asociada a las membranas, mientras que GBF1 mostró localización citosólica (Figura 17).

### **Rab1 y reclutamiento de COPI**

GBF1 promueve el reclutamiento de COPI a los sitios de salida del RE y a la interfase del Golgi por medio de la activación de Arf1 (Garcia-Mata et al., 2003). Los resultados presentados en el capítulo 2 indican que la expresión de Rab1bQ67L induce acumulación de GBF1 y COPI en la interfase formada entre los sitios de salida del retículo endoplásmico y el compartimiento intermedio (Figura 13). Posiblemente esto se deba a que Rab1b-GTP unida a las membranas mantenga a GBF1 asociada a las membranas de las estructuras por mayor tiempo, incrementando la tasa de activación de Arf1 y, consecuentemente, el reclutamiento de COPI. El hecho de que no se haya detectado ninguna modificación de la señal de Arf1-GFP en el punteado periférico de las células que expresan la construcción CFP-Rab1bQ67L (Figura 14) puede ser causa de una limitación técnica basada en la baja intensidad de la señal de las estructuras periféricas marcadas con Arf1-GFP. Alternativamente, podría deberse a que GBF1 induzca la activación en los sitios de salida del RE de otras Arfs distintas de Arf1. En este sentido se han publicado trabajos que describen que GBF1 causa el reclutamiento a las membranas de Arf GTPasas clase I y clase II (Kawamoto et al., 2002), como así también que la cooperación de dos Arfs diferentes en el mismo sitio de acción es una característica de las vías mediadas por estas GTPasas (Volpicelli-Daley et al., 2005).

A nivel del complejo de Golgi se observó que la dinámica de asociación-disociación de Arf1 a las membranas se encuentra alterada en presencia de la construcción Rab1bQ67L (Figura 14). Estos resultados indican que Rab1-GTP estabiliza a Arf1 activa en las membranas. Tal observación podría explicarse por un efecto directo de Rab1b sobre GBF1, sobre una proteína GAP de Arf1 o sobre un efector de Arf1.

Debido a que la construcción de Rab1b-GTP permanece por mayor tiempo asociada a las membranas de Golgi (Figura 12) y que en esa forma interacciona directamente con GBF1 (Figura 15), siendo capaz de incrementar su asociación a membranas (Figura 13), sumado al hecho de que la sobre-expresión de GBF1 induce estabilización de Arf1 en las membranas (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005), postulamos que Rab1b estabiliza a Arf1 en las membranas por medio de su interacción con GBF1. La existencia de una cascada Rab1-Arf1 en la vía secretoria ha sido propuesta luego de que la interacción genética en levaduras entre *ypt1* (proteína homóloga de Rab1) y *Gea ½* (homólogas de GBF1) fue descubierta (Jones et al., 1999), por lo tanto es posible que dicha cascada se encuentre también en células de mamíferos.

### **Rab1b y el transporte entre RE y Golgi**

En la interfase entre los sitios de salida del retículo endoplásmico y el compartimiento intermedio (ERGIC, VTC) el ensamblado de la cubierta COPI es requerido para la formación y la maduración de intermediarios de transporte que van a ser dirigidos al complejo de Golgi. Se cree que el rol de COPI en el transporte anterógrado entre RE y Golgi es el reclutamiento de material de reciclado que debe ser transportado nuevamente al RE (Letourneur *et al.*, 1994; Lewis and Pelham, 1996; Shima *et al.*, 1999). En las células transfectadas con Rab1bQ67L, se observó que GBF1 y  $\beta$ -COP se acumulan específicamente en estructuras periféricas próximas a las estructuras COPII (Figura 13), sugiriendo que Rab1b participa promoviendo el reclutamiento de COPI y la maduración de los intermediarios de transporte a partir de los sitios de salida del RE. En las estructuras periféricas Rab1b también interacciona con p115 (Allan *et al.*, 2000), quien a través de un complejo formado junto a GM130 y Giantin promueve la fusión de los intermediarios de transporte con las membranas del Golgi. Se ha propuesto que el papel de Rab1b en esta etapa es la promoción de la formación de este complejo (Beard *et al.*, 2005). En conjunto, los resultados obtenidos sumados a datos publicados por otros autores indican que a nivel de las estructuras periféricas Rab1b coordina tanto la formación de vesículas COPI como los eventos necesarios para su maduración y posterior fusión con las membranas del *cis*-Golgi.

### **Rab1b y el transporte intra-Golgi**

Como se mencionó anteriormente, el complejo proteico COPI también juega un papel importante en el transporte de proteínas entre las cisternas del Golgi (Love *et al.*, 1998; Lanoix *et al.*, 1999, 2001), como así también en el mantenimiento de la estructura general del complejo (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1998). Por lo tanto, Rab1b a través de su interacción con GBF1 podría estar coordinando también la formación y fusión de intermediarios del transporte intra-Golgi. Alternativamente, podría estar promoviendo otras actividades celulares que requieren la activación de Arf1, quien además de COPI, recluta una gran variedad de factores tales como proteínas de señalamiento y enzimas modificadoras de lípidos involucradas en procesos de modificación de membranas y vías de señalización (Randazzo *et al.*, 2000; Styers *et al.*, 2006).

### **Rab1b y el transporte de VSV-G**

Es aceptado que la GTPasa Rab1 es esencial para el transporte de proteínas entre RE y Golgi (Schwaninger et al., 1992) (Nuoffer et al., 1994). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el transporte de VSV-G se encuentra enlentecido pero no bloqueado al silenciar la expresión de Rab1b en células HeLa (Figura 21). Estas diferencias podrían ser debidas a que en los ensayos anteriores se utilizaron dominantes negativas para inhibir la función de Rab1, las cuales interfieren tanto con la función de Rab1a como de Rab1b. El hecho de que, a diferencia de la sobre-expresión de las dominantes negativas, la inhibición de la expresión de Rab1b mediante el uso de ARN cortos específicos no bloquee el transporte de VSV-G puede ser debido a que el silenciamiento de los niveles de Rab1b luego del tratamiento con ARN cortos no es total (Figura 17 A), y el porcentaje remanente (10% del total) podría ser suficiente como para impedir el bloqueo del transporte de VSV-G. Alternativamente, los niveles endógenos de la isoforma “a” de Rab1, que no se encuentran afectados luego del tratamiento de células HeLa con ARN cortos específicos para Rab1b (Figura 17 A), podrían ser suficientes para impedir el bloqueo del transporte de VSV-G.

### **Comportamiento dinámico de Rab1b**

La proteína Rab1 posee diversos sitios de acción en el transporte intracelular de proteínas, y actúa de manera simultánea en cada uno de ellos. En el presente trabajo se caracterizó el comportamiento dinámico de Rab1b con el fin de comprender de manera global cómo llega Rab1 a cada uno de sus sitios de acción y cuánto tiempo permanece asociada a las membranas donde actúa. Para ello se analizó la dinámica de Rab1 asociada a las estructuras periféricas y la cinética de asociación/disociación a las membranas del complejo de Golgi. Observamos que Rab1b se encuentra asociada a las estructuras periféricas sin viajar con los intermediarios de transporte hacia el complejo de Golgi (Figura 10). El patrón observado fue similar al descrito para estructuras COPII (Hammond and Glick 2000; Stephens et al., 2000) pero permaneciendo menor tiempo asociada a las membranas de las estructuras periféricas (Tabla 4). Quizás esto indique que Rab1b se asocia a las membranas y luego se disocia para promover el intercambio COPII/COPI y la maduración de los intermediarios de transporte.



Por otra parte, en relación a la dinámica de asociación/disociación de Rab1b a las membranas del Golgi, los ensayos de FRAP realizados mostraron que el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de GFP-Rab1b en las membranas del Golgi es de 120 segundos. El  $t_{1/2}$  observado es significativamente menor al de proteínas que llegan al complejo de Golgi a través del transporte de intermediarios (Ward et al., 2001) sugiriendo que la asociación de Rab1 a las membranas ocurre directamente desde el citosol, de manera independiente del transporte de intermediarios. A favor de esta hipótesis, al realizar el ensayo en condiciones donde el transporte mediado por intermediarios se encuentra abolido (Figura 11) se observó que un gran porcentaje de Rab1b pudo recuperarse. Por último, el hecho de que la mutante de Rab1b con incapacidad de hidrolizar GTP, Rab1bQ67L, permanezca mayor tiempo asociada a las membranas y no logre recuperarse totalmente durante el ensayo de FRAP (Figura 12), indica que la capacidad de ciclar de la forma GDP a la forma GTP de Rab1b es necesaria para su asociación y disociación a las membranas del Golgi.

Por último, al comparar el tiempo de vida media obtenido para Rab1b con tiempos obtenidos para proteínas relacionadas al reclutamiento de COPI se observa que Rab1b permanece asociada a las membranas por períodos de tiempo más prolongados que Arf1 (Figura 14 y (Presley et al., 2002)) y GBF1 (Niu et al., 2005; Szul et al., 2005). Esto sugiere que Rab1b permanece más tiempo asociada a las membranas para interactuar, además de GBF1, con otras proteínas como GM130, p115, Golgin84 y Giantin, y de esta manera involucrarse en distintos procesos tales como reclutamiento de COPI, fusión de membranas, mantenimiento de la estructura del Golgi, etc.

### **Rab1b y la estructura del Golgi**

Con respecto a la relación entre la función de Rab1b y el mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi, se evaluó a nivel ultra-estructural el complejo de Golgi y la interfase RE-Golgi en células con niveles endógenos de Rab1b silenciados como así también en células transfectadas con Rab1bwt o con la mutante de Rab1b constitutivamente activa.

Se observó que el silenciamiento de los niveles endógenos de Rab1b induce fragmentación de las cisternas *cis* y *trans* del Golgi marcadas con GM130 y GalT respectivamente (Figuras 18 y 19). Además mediante micro-inyección de Rab1b recombinante es posible revertir la fragmentación del complejo de Golgi causada por el silenciamiento de Rab1b, lo que sugiere un requerimiento específico de Rab1b tanto para el mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi como

para su re ensamblado (Figura 20). Luego del silenciamiento de Rab1b los niveles endógenos de la isoforma “a” de Rab1 no se encuentran afectados, pero el complejo de Golgi se encuentra fragmentado, esto podría ser un indicio de que ambas proteínas cumplen funciones distintas en el Golgi. Sin embargo, el hecho de que la micro-inyección de Rab1a recombinante también sea suficiente para revertir el fenotipo de fragmentación observado luego del silenciamiento de Rab1b, indica que las funciones de ambas isoformas son intercambiables y que el mantenimiento de la estructura del Golgi depende de la cantidad total de Rab1 en la célula, independientemente de la isoforma presente. De todos modos no se puede descartar el hecho de que a niveles endógenos ambas isoformas de Rab1 cumplan funciones distintas.

Además de los efectos del silenciamiento de Rab1b en la estructura del Golgi, es interesante destacar que se observaron cambios a nivel de los sitios de salida del RE, donde hubo un considerable incremento del número de estructuras con cubierta de tipo COPII, las cuales resultaron positivas para el marcador Sec31 (Figura 19).

Los cambios morfológicos observados al silenciar los niveles endógenos de Rab1b podrían explicarse por uno o más de los siguientes mecanismos:

1) Rab1 es requerida para el reclutamiento de COPI promoviendo la maduración de los intermediarios de transporte derivados del RE y permitiendo su llegada al complejo de Golgi (Alvarez et al., 2003). La disminución de los niveles endógenos de Rab1b induce disociación de la cubierta de tipo COPI y por consiguiente impide la maduración y llegada de intermediarios de transporte al complejo de Golgi.

2) Rab1b interacciona directamente con factores tethering como p115 y Giantin (Allan et al., 2000; Beard et al., 2005), y potencia las interacciones entre ellos promoviendo la fusión de intermediarios de transporte con las membranas del *cis*-Golgi, de esta manera la ausencia del estímulo que Rab1b ejerce sobre estas proteínas impide o disminuye la fusión de intermediarios de transporte con las membranas del Golgi.

3) Por último, la interacción de Rab1b con las proteínas Golgin84 y GM130 involucradas en el mantenimiento de la estructura del Golgi (Marra et al., 2007; Satoh et al., 2003), indica que además del rol indirecto de Rab1b promoviendo la maduración, llegada y fusión de los intermediarios de transporte con las membranas del *cis*-Golgi, podría existir un rol directo en el mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi.

En los dos primeros casos, la estructura del complejo de Golgi sería afectada por un desequilibrio en el flujo de transporte, además mediante estos dos primeros mecanismos se explica el incremento de estructuras con cubierta COPII observado en las proximidades de los sitios de salida del RE, las cuales en ausencia de Rab1b no pueden madurar, ser transportadas ni fusionarse a las membranas del *cis*-Golgi y resultan acumuladas en la interfase RE-Golgi. Esto concuerda con lo observado en los ensayos funcionales de transporte de VSV-G donde se observa que en células con niveles de Rab1b silenciados, el transporte intracelular no se encuentra bloqueado, pero si enlentecido, mostrando una retención del cargo en la interfase RE-Golgi (Figura 21). De todos modos, el hecho de que el transporte no se encuentre completamente bloqueado, favorece también la tercera hipótesis planteada, donde la fragmentación del Golgi, podría deberse a un efecto directo de Rab1 en lugar de ser una consecuencia del bloqueo del transporte. En este sentido, el rol directo de Rab1b en el mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi mediado por su interacción con proteínas tales como GM130 y Golgin84 debe ser estudiado con mayor profundidad. Igualmente, el hecho de que el patrón de fragmentación observado sea similar al descrito luego del silenciamiento de GM130 (Marra et al., 2007), sugiere que Rab1b y GM130 podrían formar parte de una misma vía de acción en el mantenimiento de la estructura del complejo de Golgi.

La fragmentación del complejo de Golgi observada luego de la sobre-expresión de la mutante de Rab1b con deficiente actividad GTPasa (Figura 25), puede ser explicada por la estabilización de Arf1 y COPI producida al sobre-expresar esta mutante de Rab1b. Para promover la fusión de un intermediario de transporte con una membrana determinada la cubierta de tipo COPI debe primero disociarse. El hecho de que GBF1, Arf1 y la cubierta de COPI sean estabilizadas en presencia de Rab1bQ67L (Figuras 13 y 14) genera un impedimento o un retardo del proceso de fusión de los intermediarios de transporte con las membranas del Golgi, encontrándose alterada la formación de nuevas cisternas *cis* del Golgi, como también el transporte intra-Golgi mediado por vesículas con cubierta COPI. De esta forma se explica el gran número de vesículas con cubierta COPI en la región yuxta-nuclear y en las proximidades de los sitios de salida del RE observados en las células que expresan la construcción Rab1bQ67L. En concordancia con nuestros resultados, se ha descrito que la constante activación de Arf1 es requerida para los cambios sobrellevados por el Golgi durante la división celular, donde se fragmenta completamente en vesículas con cubierta COPI (Xiang et al., 2007).

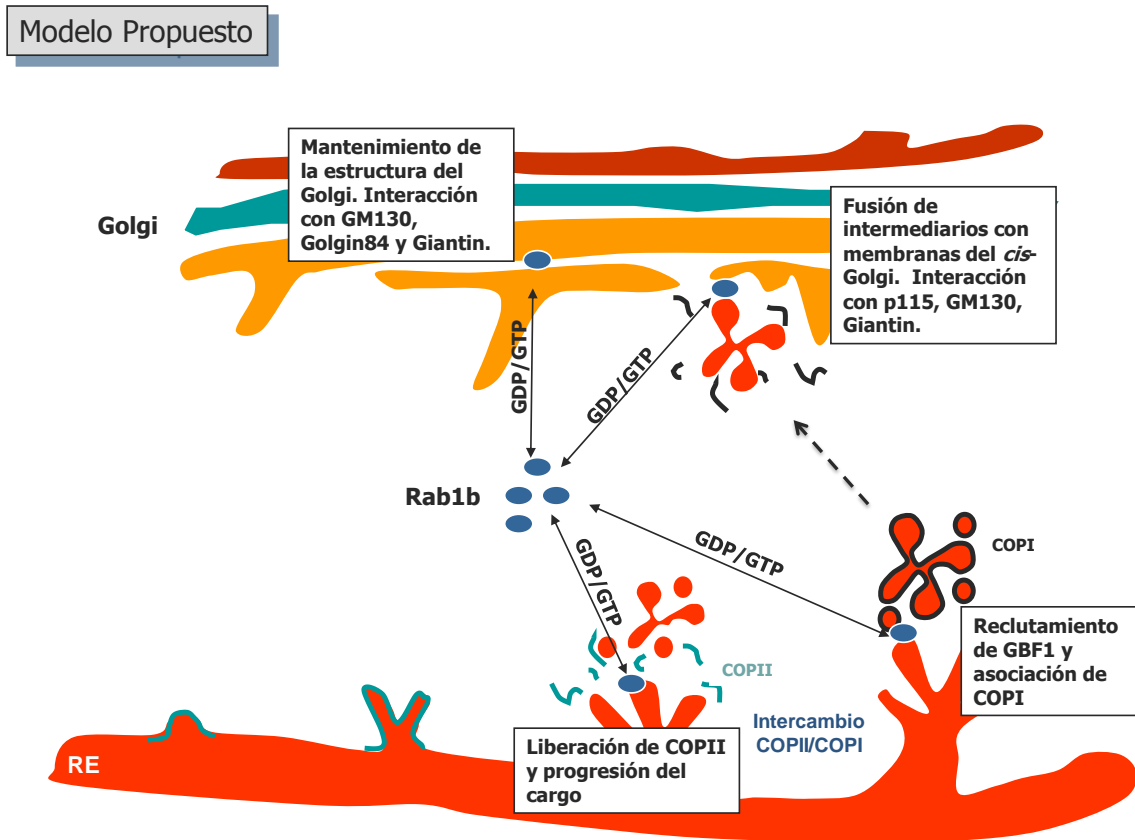
Finalmente, la sobre-expresión de Rab1bwt indujo un incremento del tamaño del Golgi sin alterar su fenotipo normal. Además del incremento en el tamaño de las cisternas del Golgi, se observó un marcado aumento del número de intermediarios de transporte en la interfase RE-Golgi (Figura 23). De manera similar, ensayos realizados en células de músculo cardíaco indican que Rab1 se encuentra involucrada en vías de señalización mediadas por MAP quinasas que conducen a un incremento del tamaño celular total y de las estructuras membranosas (Wu, 2008). Además, se ha observado que las células de tejidos con elevada actividad secretoria como tiroides, próstata y células epiteliales bronquiales, presentan mayores niveles de expresión de Rab1b que las células de tejidos con baja actividad secretoria (Gurkan et al., 2005). Por último, ensayos realizados en nuestro laboratorio indican que la sobre-expresión de Rab1b induce, mediante activación de la vía p38-MAPK, la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en distintas etapas del transporte intracelular (enviado para publicar, Romero et al). En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento de Rab1b podría ser importante para disparar una respuesta global que permita al complejo de Golgi adaptarse ante un incremento en la tasa de secreción.

### **Conclusión-Mecanismo de acción de Rab1b**

Los resultados obtenidos en los distintos campos abordados sumados a datos descritos por otros autores permiten proponer un modelo (Figura 29) donde Rab1b llega a las membranas de los sitios de salida del RE y del complejo de Golgi directamente desde las reservas citosólicas independientemente de la acción del transporte mediado por microtúbulos. Una vez en las membranas interacciona con una amplia gama de efectores para coordinar diversos procesos tales como:

- Reclutamiento de GBF1 y promoción del intercambio COPII/COPI necesario para la formación y maduración de intermediarios de transporte.
- Interacción con factores tethering (p115, Giantin, GM130) para la promoción de la fusión de intermediarios con las membranas del complejo de Golgi.
- Mantenimiento y adaptación de la estructura del complejo de Golgi ante distintos estímulos celulares.

Luego de interactuar con sus efectores, Rab1b se disocia de las membranas y retorna a las reservas citosólicas para comenzar nuevamente el ciclo.



**Figura 29. Modelo de acción de Rab1b.**

Esquema de la interfase RE-Golgi. Rab1b (esferas azules) llega a sus sitios de acción directamente desde el citosol en un mecanismo dependiente del intercambio de GDP por GTP. Los recuadros blancos indican los efectores con los cuales interacciona como así también la función que cumple Rab1b en cada uno de sus sitios de acción.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcciones de vectores plasmídicos

Los plásmidos pEGFP-Rab1b y pCDNA4TO-Rab1b (wt y mutantes) que codifican para las proteínas de fusión GFP-Rab1b y Rab1b-myc respectivamente, fueron generados previamente y están descritos en (Alvarez *et al.*, 2003). Las construcciones GST-GBF1, GST-GBF1 (1430-1859), GBF1-E794K-myc, GBF1- $\Delta$ N-E794K-myc y GST-p115 fueron gentilmente provistas por la Dra. Elizabeth Sztul (University of Alabama at Birmingham, AL). Los plásmidos Arf1-GFP y p58-YFP fueron provistos por la Dra. Jenniffer Lippincott-Schwartz (NIH, Bethesda, MD). GST-Rab5 fue gentilmente provisto por la Dra. Marisa Colombo (Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina).

Los plásmidos pGEX4T-2-Rab1b (wt y mutantes) que codifican para la proteína de fusión GST-Rab1b fueron sub-clonadas a partir del plásmido pCDNA4TO-Rab1b utilizando las enzimas de restricción EcoRI/XhoI (Promega).

La construcción GST-GBF1(1-380) se generó mediante sub-clonado de la porción amino terminal de GBF1 en el vector pGEX4T-3-. Para ello se realizó una digestión del vector pEGFP-GBF1 con las enzimas de restricción XhoI/SmaI. El inserto liberado, correspondiente a los primeros 1141 nucleótidos de GBF1 (380 aa), se introdujo en los sitios XhoI/SmaI del vector de clonado pBSKII(+) y luego, se realizó una segunda digestión con XhoI/NotI y se sub-clonó en el vector pGEX4T-3-.

### Anticuerpos utilizados

Durante este trabajo de tesis se utilizaron los siguientes anticuerpos:

Anticuerpos policlonales anti-p115 y anti-GBF1 (Garcia-Mata *et al.*, 2003) (donados por la Dra. Elizabeth Sztul, University of Alabama at Birmingham, AL). Anticuerpos policlonales anti- $\alpha$ -COP, anti- $\beta$ -COP, anti-calreticulin y anti-Sec23 (Affinity Bio Reagents). Anticuerpos policlonales anti-Rab1b, anti-Rab1a y anti-ERK1(Santa Cruz Biotechnology). Anticuerpo monoclonal anti-GM130 (Abcam). Anticuerpos monoclonales y polyclonales para inmunofluorescencias marcados con Alexa Fluor 594 y Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Anticuerpo monoclonal anti-c-myc (Invitrogen). Anticuerpo policlonal anti-ERGIC53 (Schweizer *et al.*, 1988) donado por el Dr. Hans-Peter Sauri (University of Basel, Suiza). Anticuerpos polyclonales anti-GalT, TGN46, Golgin97 y Sec31 provistos por la Dra. Maria Antonietta De Matteis (DCBO, Consorzio Mario Negri Sud, Chieti, Italia).

### **Líneas celulares humanas**

Para el desarrollo de los diferentes experimentos realizados en este trabajo de tesis se utilizaron células HeLa (<http://www.atcc.org>). Esta línea celular epitelial deriva de un adenocarcinoma de cérvix conteniendo el virus papiloma humano 18 (HPV-18). La línea celular se mantuvo en cultivo en placas de 100 mm en medio D-MEM (Gibco) alta glucosa suplementado con 10% suero fetal bovino (Bioser), 50 U/ml final de penicilina y 50 µg/ml final de estreptomina (medio completo, Gibco), en un incubador apropiado con temperatura constante de 37°C y en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Transfección de líneas celulares**

Para los ensayos transfección de líneas celulares se utilizó el reactivo LTI-transit (Mirus). El protocolo utilizado fue el sugerido por el fabricante y asegura una eficiencia de transfección superior al 50%, dependiendo del tipo celular. Brevemente:

-24 horas antes de la transfección colocar las células en una placa multiwell-6 a una confluencia aproximada del 50%.

-En un tubo eppendorf con 150 µl de Optimem (Gibco), colocar gota a gota 3 µl de reactivo LTI-transit. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

-Agregar gota a gota 800 ng de ADN plasmídico. Agitar e incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

-Agregar la mezcla al cultivo celular y crecer las células por 12 horas. Cambiar el medio y continuar la incubación por el tiempo deseado.

### **Células bacterianas**

Las bacterias en este trabajo fueron utilizadas como herramientas tanto para amplificación y mantenimiento de plásmidos como para expresión de proteínas de fusión. Todos los plásmidos descritos se mantuvieron y amplificaron en bacterias pertenecientes a la cepa de *Escherichia Coli* DH5-α. Las construcciones con el vector pGEX fueron luego utilizadas para transformar bacterias pertenecientes a la cepa de *Escherichia coli* BL21 debido a que esta cepa posee deficiente actividad proteolítica en el citoplasma (*OmpT* y *Lon*) y favorece la expresión de proteínas de fusión.

**Preparación de bacterias competentes**

Durante el presente trabajo se utilizaron distintos tipos de bacterias competentes, a continuación se describe el protocolo utilizado para preparar unas de ellas:

- Repicar una cepa fresca de bacterias conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio LB-Agar (Luria Bertani-Agar) e incubar toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Inocular 5 ml de medio LB con una colonia aislada e incubar toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Inocular 100 ml de medio LB con 2 ml del cultivo anterior e incubar hasta  $\text{DO}_{600} = 0,3-0,6$ .
- Centrifugar el cultivo por 5 minutos a 3000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  (rotor previamente refrigerado).
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con suavidad en 5 ml de medio LB con 10% de PEG, 5% de DMSO, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$ , 15% de Glicerol (todo en hielo).
- Fraccionar en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ .
- Congelar en  $\text{N}_2$  líquido o aire líquido y guardar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Transformación de bacterias competentes**

- Incubar las bacterias competentes por 10 minutos en hielo.
- Agregar ADN (10-100 ng) e incubar 30 minutos en hielo.
- Incubar 1 minuto a  $42^{\circ}\text{C}$ .
- Agregar 900  $\mu\text{l}$  de LB.
- Incubar en agitador a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.
- Centrifugar 5 minutos a 1500 rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender en 200  $\mu\text{l}$  de LB.
- Plaquar en LB-Agar (con el antibiótico necesario para seleccionar las células transformadas).
- incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  12-24 horas.

**Inducción de proteínas de fusión unidas a GST**

La inducción de proteínas de fusión con GST se llevó a cabo de acuerdo a lo sugerido por el fabricante (Amersham Biosciences). A continuación se describe brevemente el protocolo utilizado:

- Repicar del stock guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$  bacterias BL21 transformadas con pGEX4T3 (Rab1, Rab5, GBF1, N-GBF1, C-GBF1, p115, etc) en frascos de 5 ml de LB líquido (ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e incubar durante toda la noche en agitador a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- Dispensar 100  $\mu\text{l}$  del cultivo en 10 ml de LB líquido (ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) e incubar en agitador a  $37^{\circ}\text{C}$ . Crecer hasta que la  $\text{DO}_{595}$  llegue a 0.5–0.6 (aproximadamente 2 horas).



- Agregar 10  $\mu$ l de IPTG 1 M (concentración final 10 mM) e incubar en agitador a 37°C durante 2 horas.
- Centrifugar 5 min a 5000 rpm a 4°C. Resuspender el precipitado en 10 ml de PBS (5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5  $\mu$ g/ml DNAsa; 5  $\mu$ g/ml RNAsa; 5 mM 2-mercapto-etanol; 0,2% NP-40; Inhibidores de proteasas). Fraccionar en alícuotas de 750  $\mu$ l.
- Verificar la inducción mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS coloreado con azul brillante de Coomasie.

#### **Purificación de proteínas de fusión unidas a GST (Christoforidis and Zerial, 2000)**

- Lisis bacteriana. Someter los viales guardados a -80°C a ciclos de congelación/descongelación. Repetir 6 veces el pasaje de los viales de un baño de aire líquido a un baño a 37°C.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
- Correr el precipitado y sobrenadante en un gel de poliacrilamida-SDS para observar si la proteína inducida se encuentra en la fracción soluble o no.
- Lavar la resina (50  $\mu$ l de Glutathion Sepharosa 50%) con 10 ml de PBS 1x para equilibrarla.
- Incubar la fracción que contiene la proteína sobre-expresada con la resina de Glutathion Sepharosa 50% durante 30 minutos a temperatura ambiente bajos constante agitación.
- Centrifugar 5 minutos a 1000 rpm a 4°C. Guardar el sobrenadante para controlar la eficiencia de la unión.
- Lavar 4 veces las partículas de sepharosa con 400  $\mu$ l de buffer de lavado (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM 2 M-E, 100mM GTP $\gamma$ S/GDP, en PBS1x).
- Resuspender la resina con la proteína unida en 200  $\mu$ l de buffer NS (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl, 1 mM DTT, 1 mM GTP $\gamma$ S/GDP).
- Correr un gel de PAA parte de la resina para observar si hay proteína unida (además correr las fracciones no unidas de pasos anteriores).

#### **Preparación Rab1b recombinante**

- Unir GST-Rab1b purificada a Glutation-sepharosa.
- Incubar con trombina (Amersham Biosciences) durante 16 horas a temperatura ambiente.
- Centrifugar 5 minutos a 2000 rpm y recuperar el sobrenadante.
- Para eliminar el exceso de trombina, incubar con Benzamidina-sepharosa (Amersham Biosciences) durante 1 hora a temperatura ambiente. Centrifugar y recuperar el sobrenadante.

- Para eliminar trazas de GST, incubar con Glutation-sefarosa 30 minutos a temperatura ambiente.
- Fraccionar el sobrenadante en alícuotas de 200 µl y guardar a -80°C.

#### **Preparación de citosol de hígado de rata**

El citosol de hígado de rata se obtuvo de acuerdo a lo descrito en (Alvarez et al., 1999).

Brevemente:

- Extraer el hígado de una rata wistar adulta.
- Trozar el hígado, agregar un volumen de buffer de homogenización frío (20 mM Hepes, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7,5) y homogenizar.
- Centrifugar homogenato a 10.000g durante 15 minutos a 4°C.
- Recolectar el sobrenadante y centrifugar a 100.000g durante 60 minutos a 4°C.
- Fraccionar el sobrenadante en alícuotas de 500 ul, congelar en nitrógeno líquido y guardar a -80°C.

#### **Ensayos de interacción de proteínas (Pull Down)**

- Incubar cantidades similares de proteínas de fusión (GST-Rab1, GST Rab5, GST-p115, GST-GBF1, etc.) unidas a glutatión sepharosa, con Rab1b recombinante purificada (interacción directa) o con citosol de hígado de rata durante 2 horas a 4°C en presencia de GTPγS (100 mM) o GDP (100 mM).
- Realizar 4 lavados con buffer NS (20mM HEPES, 100mM NaCl, 5mM MgCl, 1mM DTT, 1mM GTPγS/GDP).
- Evaluar la identidad de las proteínas unidas a cada fracción mediante ensayos de Western blot.

#### **Ensayos de inmuno-fluorescencia (IF)**

La técnica de inmunofluorescencia permite observar la localización sub-celular de proteínas de interés. Para su observación se utilizó tanto un microscopio de epi-fluorescencia (Nikon Eclipse TE-2000, CIBICI-CONICET) como un microscopio de fluorescencia confocal (Zeiss LSM Pascale, CIQUIBIC-CONICET).

##### Protocolo:

- Crecer las células sobre cubreobjetos estériles dispuestos dentro de las placas de cultivo.
- Lavar las células 3 veces con PBS 1X.
- Levantar los cubreobjetos con las células adheridas y colocarlos en una cámara húmeda.
- Fijar las células incubando 10 min con para-formaldehído 3% en PBS.

- Incubar 10 min con solución 10 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en PBS 1X
- Lavar 3 veces (3 min cada lavado) con PBS 1X
- Permeabilizar las células incubando 7 min con PBS 1X 0.01% Triton X-100
- Realizar 3 lavados con PBS1X (2 min cada lavado)
- Bloquear 5 minutos con PBS 1x, 2.5% Goat Serum (Sigma-Aldrich), 0.2% Tween-20 (H5152, Promega, Madison, WI)
- Bloquear 5 min con PBS 1x, 0.4% Fish Skin Gelatin (Sigma-Aldrich), 0.2% Tween.
- Diluir el anticuerpo primario en fish skin gelatin e incubar durante 45 min a 37°C en cámara húmeda
- Realizar 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X, 0.2% Tween 20.
- Bloquear 5 minutos con PBS 1x, 2.5% Goat Serum, 0.2% Tween.
- Bloquear 5 minutos con PBS 1x, 0.4% Fish Skin Gelatin, 0.2% Tween.
- Diluir el anticuerpo secundario en PBS 1x, 2,5% Goat Serum e incubar durante 30 min a 37°C en cámara húmeda.
- Realizar 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X, 0.2% Tween.
- Montar los vidrios utilizando líquido de montaje (Mowiol, Calbiochem).
- Dejar secar a temperatura ambiente o a 4°C por 12 horas.
- Observar en microscopio de fluorescencia a la longitud de onda apropiada.

### **Ensayos de microscopía *in vivo***

Para los ensayos de microscopía *in vivo* las células se crecieron en placas con fondo de vidrio (WillCo-dish) en medio DMEM con 10% de SFB. Todos los ensayos se realizaron a 25°C utilizando el microscopio de fluorescencia confocal LSM Pascal (Carl Zeiss) del departamento de Química Biológica (FCQ, UNC). Las imágenes se capturaron con un objetivo de 63x apocromático (apertura numérica 1,4; z-stack 1  $\mu\text{m}$ ) y se procesaron con Adobe photoshop 6.0 para la presentación. Para el análisis de GFP en células que expresan CFP, la excitación se realizó a 488 nm y la emisión de GFP se recuperó utilizando un filtro LP530 nm. Bajo estas condiciones, la emisión de CFP no es detectada.

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

Para los ensayos de FRAP se tomó una imagen inicial a 0,05% de intensidad de laser. Luego, la región de interés (RDI) se foto-blanqueó mediante exposición durante 3 segundos al 100% de intensidad del laser. Posteriormente, la recuperación de la fluorescencia en la RDI se monitoreó

tomando imágenes al 0,05% de intensidad del laser cada 10 o 20 segundos durante 10 minutos. La intensidad promedio de la RDI y de regiones de referencia (RDR) se midió utilizando el software Metamorph (Universal Imaging Corporation). Luego se graficó el porcentaje de recuperación de la fluorescencia en el tiempo de acuerdo a la siguiente fórmula:  $F(t) = (F_{RDI} / F_{RDR}) / (F_{preRDI} / F_{preRDR}) \times 100$ , donde  $F_{preRDR}$  es la intensidad de fluorescencia de RDR antes del foto-blanqueado,  $F_{RDR}$  es la intensidad de fluorescencia de RDR al tiempo  $t$ ,  $F_{preRDI}$  representa la intensidad de RDI antes del foto-blanqueado, y  $F_{ROI}$  es la intensidad de RDI al tiempo  $t$ . El número de células evaluadas en cada ensayo está indicado por la letra  $n$ .

#### Ensayos de Time-Lapse

Para los ensayos de time-lapse se tomaron imágenes cada cuatro segundos durante un tiempo total de 10 minutos a 0,05% de intensidad del laser. La cuantificación del movimiento se realizó con el LSM Pascale software (Zeis). Para los ensayos de BFA, se tomó una imagen previa al tratamiento y luego a las células se les agregó 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de BFA. El porcentaje de disociación de la fluorescencia de las membranas se monitoró mediante imágenes tomadas con 0,05% de intensidad del laser cada 30 segundos durante 10 minutos. Luego, la intensidad de fluorescencia promedio se midió utilizando el software Methamorph (Universal Imaging Corporation)

#### **Preparación de extractos celulares**

- Lavar 2 veces las células con PBS 1X. Levantar las células en PBS 1X y centrifugar 5 minutos a 5000 rpm.
- Resuspender en 100  $\mu\text{l}$  de buffer RIPA (50mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% DOC, 0,1% SDS, inhibidores de proteasas).
- Realizar 10 pasajes por jeringa de tuberculina e incubar 30 minutos en hielo.
- Centrifugar 10 minutos a 10000 rpm. Recuperar sobrenadante.
- Cuantificar la concentración de proteínas por la técnica de Bradford.

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

El reactivo de Bradford permite medir sensiblemente proteínas en soluciones a concentraciones bajas.

#### Protocolo:

- El reactivo de Bradford comercial (5X, 500-0006, BIORAD, USA) debe ser diluido en un volumen adecuado de agua destilada.
- Posteriormente se debe filtrar la dilución en papel Whatman #1 para remover impurezas no solubles del reactivo. Esta dilución filtrada es estable por dos semanas.
- Preparar diluciones de albúmina a partir de una solución madre de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  para confeccionar una curva de calibración con los puntos 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (solo reactivo); 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 2,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 5,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 10,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 15,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 20,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  que cubren el rango analítico del método.
- Dispensar 1-10  $\mu\text{l}$  de muestra en tubos conteniendo 200  $\mu\text{l}$  de la dilución de reactivo.
- Incubar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- Medir la absorbancia en un lector de placas de ELISA (96 pocillos) a 595 nm (en su defecto a 570 nm).
- Graficar unidades de absorbancia en función de la concentración y realizar análisis de regresión lineal simple. Para que la curva sea estadísticamente aceptable se debe considerar un  $R^2 > 0,95$ .
- A partir de la ecuación de la recta despejar el valor de concentración de las muestras problema.

#### **Separación de proteínas por peso molecular en geles de Poliacrilamida con SDS (PAA-SDS).**

Para separar las proteínas de extractos proteicos bacterianos o de células eucariotas se utilizó la técnica de separación en geles de poliacrilamida-SDS (PAA-SDS), que permite separar proteínas por su peso molecular. El porcentaje de entrecruzamiento se definió de acuerdo a las necesidades de cada separación. La identificación de las proteínas separadas se hizo mediante técnicas de unión a colorantes (Azul de Coomassie), o por reconocimiento con anticuerpos específicos (Western Blot) de acuerdo a los siguientes protocolos.

#### **Tinción con Azul brillante de Coomassie**

- Sumergir el gel de PAA-SDS en la solución de coloración (40% Metanol, 10% Acido acético, 0,025 g/l R-250).
- Incubar 3 horas a temperatura ambiente bajo constante agitación.
- Descartar el colorante y agregar igual volumen de solución decolorante (40% metanol, 10% acido acético).
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Descartar la solución utilizada y colocar nueva. Repetir este procedimiento hasta que el gel alcance la coloración deseada.

### **Identificación de proteínas por Western Blot**

- Transferir el gel de PAA-SDS a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo de transferencia en seco (Bio Rad) durante 50 minutos a 20 V.
- Realizar tinción con rojo Ponceau para verificar la transferencia de las proteínas. Brevemente, colocar la membrana de nitrocelulosa en una cuba limpia. Agregar solución colorante (0,2% Rojo Ponceau, 3% Acido tricloroacético, 3% Acido Sulfosalicílico). Incubar 5 min a temperatura ambiente. Enjuagar con agua destilada.
- De acuerdo a la coloración, marcar el marcador de peso molecular y cortar la membrana.
- Bloqueo. Incubar la membrana con 20 ml de TBS; Tween 0,1%; Leche descremada al 2,5% durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante y agregar las soluciones con los anticuerpos diluidos en TBS.
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente bajo constante agitación.
- Realizar 3 lavados de 5 minutos con 10 ml de TBS-Tween.
- Agregar anticuerpos secundarios marcados con HRP (Horse-radish peroxidase) diluidos en TBS.
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente bajo constante agitación.
- Realizar tres lavados de 5 minutos con 10 ml de TBS-Tween y un lavado con 10 ml de TBS.
- Revelar utilizando reactivo de quimio-luminiscencia (Super Signal West Pico, Pierce).

### **Silenciamiento de la expresión de genes por ARN de interferencia**

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

- Crecer 50.000-80.000 células por pocillo en una placa multiwell de 6 pocillos en medio DMEM (10% suero fetal bovino, sin antibióticos).
- Una vez adheridas, verificar que la confluencia celular sea cercana al 50%.
- 30 minutos antes de la transfección, cambiar el medio de las células por 1 ml de Optimem (Gibco) sin suero ni antibiótico.
- Para cada pocillo mezclar 125  $\mu$ l de medio Optimem con 5  $\mu$ l de reactivo SilentFect (Bio Rad) e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

- Para cada pocillo mezclar 125  $\mu$ l de Optimem con la cantidad necesaria de ARN cortos (50, 100 o 200 nM) e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Mezclar las soluciones de los 2 pasos anteriores e incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar la mezcla a las células. Luego de 6 horas de realizada la transfección agregar a las células medio DMEM con 20% de suero (para que quede al 10% final). No sacar el medio de transfección.
- A las 36 horas cambiar el medio de cultivo (DMEM, 10% suero fetal bovino, 1% penicilina-estreptomicina), y continuar con la incubación a 37°C.
- Luego de 72 horas de incubación procesar las células para ensayos de inmuno-fluorescencia y western blot para evaluar el nivel endógeno de la proteína silenciada.

### **Ensayo de transporte de VSVG**

Los ensayos funcionales de transporte de VSVG (vesicular stomatitis virus glycoprotein) se realizaron tanto en células transfectadas con GFP-Rab1b (wt y mutantes) como en células transfectadas con ARN de interferencia específico para Rab1b.

#### Protocolo:

- Lavar las células 3 veces con medio (DMEM, 20 mM Hepes, 1% penicilina-estreptomicina, pH 7,3).
- Agregar 500  $\mu$ l de medio conteniendo el virus (la dilución a utilizar debe ser ajustada experimentalmente) e incubar 1 hora a 32°C. (*Infección*).
- Lavar las células 3 veces con medio (DMEM, 20 mM Hepes, 1% penicilina/estreptomicina, pH 7,3, 10% suero fetal bovino).
- Incubar 2 horas a 40 °C (*acumulación de VSVG en el RE*).
- Agregar medio atemperado a 32°C (DMEM; 20 mM Hepes; 1% penicilina/estreptomicina; pH 7,3; 10% suero fetal bovino; e incubar a 32°C. (*Transporte*).
- La evaluación del transporte se realiza mediante ensayos de IF a distintos tiempos (0, 30, 60 y 90 minutos).

### **Fraccionamiento sub-celular**

El ensayo de fraccionamiento sub-celular se realizó para evaluar la cantidad de GBF1 asociada a las membranas en células tratadas previamente con ARN cortos específicos para Rab1b. El protocolo que se utilizó fue una modificación del descrito en (Szul *et al.*, 2005). Brevemente:

- Lavar las células 3 veces con 5 ml de PBS 1x.

- Resuspender en 300  $\mu$ l buffer de homogenización (50mM HEPES–KOH, pH 7.5, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT e inhibidores de proteasas).
- Realizar 10 pasajes por una jeringa de tuberculina. Incubar 30 minutos en hielo.
- Centrifugar a 1000g durante 15 minutos a 4°C para precipitar los núcleos y células intactas. Recuperar el sobrenadante post-nuclear (SPN).
- Centrifugar el SPN a 100.000g por 60 minutos. Guardar el sobrenadante como fracción citosólica (C).
- Resuspender el pellet en 300  $\mu$ l buffer de homogenización y centrifugar nuevamente a 100.000g por 60 minutos. Descartar el sobrenadante y guardar el pellet como fracción de membranas (M).
- Sembrar en un gel de PAA cantidades equivalentes de cada fracción y realizar un ensayo de western blot para evaluar los niveles de GBF1. Utilizar calnexina como control de membranas y ERK1 como control citosólico.

### **Ensayos de Microscopía electrónica**

Los ensayos de microscopía electrónica se realizaron en su totalidad en el Departamento de Biología Celular y Oncología del Consorzio Mario Negri Sud (DCBO-CMNS) el cual posee un laboratorio especializado en el área. Las muestras fueron preparadas y luego entregadas al personal especializado para su procesamiento. A continuación se describen los protocolos seguidos y realizados para la preparación de las muestras.

#### Microscopía Electrónica (ME) de células transfectadas con ARN cortos

- Crecer células HeLa (100.000 por pocillo) en placas multiwell de 6 pocillos conteniendo vidrios para IF. Incubar a 37 °C durante 24 horas.
- Transfectar con ARNc-Control o ARNc-Rab1b a una concentración de 100nM de acuerdo al protocolo descrito previamente.
- 72 horas luego de la transfección, levantar los vidrios para realizar IF y controlar el silenciamiento de Rab1b.
- Si el silenciamiento observado es el esperado, continuar con la preparación de las células restantes. Agregar por pocillo 1 ml de solución de Glutaraldehído 2,5% en PBS durante 5 minutos.
- Lavar 3 veces con PBS.
- Levantar las células con espátula, colocar en tubo de 1,5 ml y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.



-Procesar para microscopía electrónica (Laboratorio de Microscopía electrónica del DCBO-CMNS).

CLEM (Correlative Light Electron Microscopy) de células transfectadas con GFP-Rab1bwt o GFP-Rab1bQ67L

-Crecer células HeLa en placas con fondo de vidrio grillado (Mattek dishes) a la confluencia deseada (60.000 células para un 80% de confluencia).

-Transfectar con plásmidos que expresen la proteína de interés fusionada a GFP e incubar por 48 horas.

-Descartar el medio y fijar las células con solución de Glutaraldehído 2.5% en PBS durante 5 minutos.

-Lavar 3 veces con PBS.

-Buscar en un microscopio de fluorescencia la célula de interés. Tomar fotos en campo brillante o contraste de fase de manera que se observe la posición de la célula de interés en la grilla dibujada en el fondo de la placa.

-Una vez localizada la célula, procesar la placa para microscopía electrónica (Laboratorio de Microscopía electrónica del CMNS).

### **Soluciones utilizadas**

A continuación se detalla la composición de las principales soluciones que se utilizaron para este trabajo.

#### **PBS (Phosphate Buffered Saline)**

137 mM NaCl

10 mM Fosfato

2.7 mM KCl

pH 7.4

#### **RIPA**

50mM Tris-HCl

150mM NaCl

1% NP40

0.5% DOC

0.1% SDS

Inhibidores de proteasas 1x (Complete EDTA-free, Roche)

pH 8.0

#### **TBS (Tris Buffered Saline)**

20 mM Tris-HCl

150 mM NaCl

pH 7.5

#### **Buffer de homogenización**

50 mM Hepes

100 mM KCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM DTT

Inhibidores de proteasas 1x (Complete EDTA-free, Roche)

pH 7.5

**Buffer NS** (Nucleotide Stabilization)

20 mM Hepes

100 mM NaCl

5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM DTT

1 mM GTP $\gamma$ S/GDP

Inhibidores de proteasas 1x (Complete EDTA-free, Roche)

pH 7.4

**BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA**

**Ali, B. R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M. and Seabra, M. C.** (2004). Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J Cell Sci* **117**, 6401-12.

**Altan-Bonnet, N., Sougrat, R. and Lippincott-Schwartz, J.** (2004). Molecular basis for Golgi maintenance and biogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 364-72.

**Alvarez, C., Garcia-Mata, R., Brandon, E. and Sztul, E.** (2003). COPI recruitment is modulated by a Rab1b-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* **14**, 2116-27.

**Allan, B. B., Moyer, B. D. and Balch, W. E.** (2000). Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* **289**, 444-8.

**Balch, W. E.** (1990). Small GTP-binding proteins in vesicular transport. *Trends Biochem Sci* **15**, 473-7.

**Bannykh, S. I., Nishimura, N. and Balch, W. E.** (1998). Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol* **8**, 21-5.

**Barlowe, C., d'Enfert, C. and Schekman, R.** (1993). Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **268**, 873-9.

**Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R.** (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.

**Bayer, M., Fischer, J., Kremerskothen, J., Ossendorf, E., Matanis, T., Konczal, M., Weide, T. and Barnekow, A.** (2005). Identification and characterization of Iporin as a novel interaction partner for rab1. *BMC Cell Biol* **6**, 15.

**Beard, M., Satoh, A., Shorter, J. and Warren, G.** (2005). A cryptic Rab1-binding site in the p115 tethering protein. *J Biol Chem* **280**, 25840-8.

**Bethune, J., Wieland, F. and Moelleken, J.** (2006). COPI-mediated transport. *J Membr Biol* **211**, 65-79.

- Blobel, G. and Dobberstein, B.** (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**, 835-51.
- Bonifacino, J. S. and Glick, B. S.** (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153-66.
- Brauers, A., Schurmann, A., Massmann, S., Muhl-Zurbes, P., Becker, W., Kainulainen, H., Lie, C. and Joost, H. G.** (1996). Alternative mRNA splicing of the novel GTPase Rab28 generates isoforms with different C-termini. *Eur J Biochem* **237**, 833-40.
- Brown, H. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. and Sternweis, P. C.** (1993). ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-44.
- Bucci, C., Lutcke, A., Steele-Mortimer, O., Olkkonen, V. M., Dupree, P., Chiariello, M., Bruni, C. B., Simons, K. and Zerial, M.** (1995). Co-operative regulation of endocytosis by three Rab5 isoforms. *FEBS Lett* **366**, 65-71.
- Bucci, C., Parton, R. G., Mather, I. H., Stunnenberg, H., Simons, K., Hoflack, B. and Zerial, M.** (1992). The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* **70**, 715-28.
- Caswell, P. T., Spence, H. J., Parsons, M., White, D. P., Clark, K., Cheng, K. W., Mills, G. B., Humphries, M. J., Messent, A. J., Anderson, K. I. et al.** (2007). Rab25 associates with alpha5beta1 integrin to promote invasive migration in 3D microenvironments. *Dev Cell* **13**, 496-510.
- Collins, R. N.** (2003). "Getting it on"--GDI displacement and small GTPase membrane recruitment. *Mol Cell* **12**, 1064-6.
- Craighead, M. W., Bowden, S., Watson, R. and Armstrong, J.** (1993). Function of the ypt2 gene in the exocytic pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **4**, 1069-76.
- Cuif, M. H., Possmayer, F., Zander, H., Bordes, N., Jollivet, F., Couedel-Courteille, A., Janoueix-Lerosey, I., Langsley, G., Bornens, M. and Goud, B.** (1999). Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *Embo J* **18**, 1772-82.
- Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. and Zerial, M.** (1991). Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-72.

- Chavrier, P., Simons, K. and Zerial, M.** (1992). The complexity of the Rab and Rho GTP-binding protein subfamilies revealed by a PCR cloning approach. *Gene* **112**, 261-4.
- Chavrier, P., Vingron, M., Sander, C., Simons, K. and Zerial, M.** (1990). Molecular cloning of YPT1/SEC4-related cDNAs from an epithelial cell line. *Mol Cell Biol* **10**, 6578-85.
- Chen, D., Guo, J., Miki, T., Tachibana, M. and Gahl, W. A.** (1996). Molecular cloning of two novel rab genes from human melanocytes. *Gene* **174**, 129-34.
- Chen, W., Feng, Y., Chen, D. and Wandinger-Ness, A.** (1998). Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell* **9**, 3241-57.
- Cheng, K. W., Lahad, J. P., Kuo, W. L., Lapuk, A., Yamada, K., Auersperg, N., Liu, J., Smith-McCune, K., Lu, K. H., Fishman, D. et al.** (2004). The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med* **10**, 1251-6.
- Cherfils, J. and Melancon, P.** (2005). On the action of Brefeldin A on Sec7-stimulated membrane-recruitment and GDP/GTP exchange of Arf proteins. *Biochem Soc Trans* **33**, 635-8.
- Christoforidis, S. and Zerial, M.** (2000). Purification and identification of novel Rab effectors using affinity chromatography. *Methods* **20**, 403-10.
- Chua, C. E. and Tang, B. L.** (2006). alpha-synuclein and Parkinson's disease: the first roadblock. *J Cell Mol Med* **10**, 837-46.
- D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P.** (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347-58.
- Das Sarma, J., Kaplan, B. E., Willemsen, D. and Koval, M.** (2008). Identification of rab20 as a potential regulator of connexin 43 trafficking. *Cell Commun Adhes* **15**, 65-74.
- de Leeuw, H. P., Koster, P. M., Calafat, J., Janssen, H., van Zonneveld, A. J., van Mourik, J. A. and Voorberg, J.** (1998). Small GTP-binding proteins in human endothelial cells. *Br J Haematol* **103**, 15-9.
- Dell'Angelica, E. C., Ohno, H., Ooi, C. E., Rabinovich, E., Roche, K. W. and Bonifacino, J. S.** (1997). AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *Embo J* **16**, 917-28.

**Dell'Angelica, E. C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R. C., Vargas, J. D., Hartnell, L. M. and Bonifacino, J. S.** (2000). GGAs: a family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J Cell Biol* **149**, 81-94.

**Der, C. J. and Balch, W. E.** (2000). GTPase traffic control. *Nature* **405**, 749, 751-2.

**Derby, M. C., Lieu, Z. Z., Brown, D., Stow, J. L., Goud, B. and Gleeson, P. A.** (2007). The trans-Golgi network golgin, GCC185, is required for endosome-to-Golgi transport and maintenance of Golgi structure. *Traffic* **8**, 758-73.

**Desnoyers, L., Anant, J. S. and Seabra, M. C.** (1996). Geranylgeranylation of Rab proteins. *Biochem Soc Trans* **24**, 699-703.

**Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B. L., Odum, N. and Geisler, C.** (1997). Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol* **138**, 271-81.

**Donaldson, J. G., Cassel, D., Kahn, R. A. and Klausner, R. D.** (1992). ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatamer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 6408-12.

**Elferink, L. A., Anzai, K. and Scheller, R. H.** (1992). rab15, a novel low molecular weight GTP-binding protein specifically expressed in rat brain. *J Biol Chem* **267**, 5768-75.

**Farnsworth, C. C., Seabra, M. C., Ericsson, L. H., Gelb, M. H. and Glomset, J. A.** (1994). Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11963-7.

**Feig, L. A. and Cooper, G. M.** (1988). Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP. *Mol Cell Biol* **8**, 3235-43.

**Feng, Y., Press, B. and Wandinger-Ness, A.** (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* **131**, 1435-52.

**Fischer von Mollard, G., Mignery, G. A., Baumert, M., Perin, M. S., Hanson, T. J., Burger, P. M., Jahn, R. and Sudhof, T. C.** (1990). rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1988-92.

- Friedlander, R., Jarosch, E., Urban, J., Volkwein, C. and Sommer, T.** (2000). A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 379-84.
- Fukuda, M.** (2008). Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2801-13.
- Fukuda, M. and Itoh, T.** (2008). Direct link between Atg protein and small GTPase Rab: Atg16L functions as a potential Rab33 effector in mammals. *Autophagy* **4**, 824-6.
- Garcia-Mata, R. and Sztul, E.** (2003). The membrane-tethering protein p115 interacts with GBF1, an ARF guanine-nucleotide-exchange factor. *EMBO Rep* **4**, 320-5.
- Garcia-Mata, R., Szul, T., Alvarez, C. and Sztul, E.** (2003). ADP-ribosylation factor/COPI-dependent events at the endoplasmic reticulum-Golgi interface are regulated by the guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Mol Biol Cell* **14**, 2250-61.
- 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**, 3753-66.
- Glick, B. S. and Malhotra, V.** (1998). The curious status of the Golgi apparatus. *Cell* **95**, 883-9.
- Goud, B., Yang, C., Roa, M., Martinez, O. and Mayau, V.** (1994). Study of rab6, a ras-like GTP-binding protein associated with the Golgi complex. *Ann N Y Acad Sci* **710**, 192-5.
- Goud, B., Zahraoui, A., Tavitian, A. and Saraste, J.** (1990). Small GTP-binding protein associated with Golgi cisternae. *Nature* **345**, 553-6.
- Guo, A., Wang, T., Ng, E. L., Aulia, S., Chong, K. H., Teng, F. Y., Wang, Y. and Tang, B. L.** (2006). Open brain gene product Rab23: expression pattern in the adult mouse brain and functional characterization. *J Neurosci Res* **83**, 1118-27.
- Gurkan, C., Lapp, H., Alory, C., Su, A. I., Hogenesch, J. and Balch, W. E.** (2005). Large-Scale Profiling of Rab GTPase Trafficking Networks: The Membrane. *Mol Biol Cell*.
- Hara-Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F. T. and Rothman, J. E.** (1994). En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP- coated vesicles. *J Cell Biol* **124**, 883-92.
- Haubruck, H., Prange, R., Vorgias, C. and Gallwitz, D.** (1989). The ras-related mouse ypt1 protein can functionally replace the YPT1 gene product in yeast. *Embo J* **8**, 1427-32.



- Haucke, V. and De Camilli, P.** (1999). AP-2 recruitment to synaptotagmin stimulated by tyrosine-based endocytic motifs. *Science* **285**, 1268-71.
- Helms, J. B. and Rothman, J. E.** (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 352-4.
- Hou, Q., Wu, Y. H., Grabsch, H., Zhu, Y., Leong, S. H., Ganesan, K., Cross, D., Tan, L. K., Tao, J., Gopalakrishnan, V. et al.** (2008). Integrative genomics identifies RAB23 as an invasion mediator gene in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res* **68**, 4623-30.
- Huber, L. A., Pimplikar, S., Parton, R. G., Virta, H., Zerial, M. and Simons, K.** (1993). Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J Cell Biol* **123**, 35-45.
- Iida, H., Noda, M., Kaneko, T., Doiguchi, M. and Mori, T.** (2005). Identification of rab12 as a vesicle-associated small GTPase highly expressed in Sertoli cells of rat testis. *Mol Reprod Dev* **71**, 178-85.
- Iida, H., Wang, L., Nishii, K., Ookuma, A. and Shibata, Y.** (1996). Identification of rab12 as a secretory granule-associated small GTP-binding protein in atrial myocytes. *Circ Res* **78**, 343-7.
- Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T. and Fukuda, M.** (2008). Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Mol Biol Cell* **19**, 2916-25.
- Izumi, T., Gomi, H., Kasai, K., Mizutani, S. and Torii, S.** (2003). The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways. *Cell Struct Funct* **28**, 465-74.
- Jones, S., Jedd, G., Kahn, R. A., Franzusoff, A., Bartolini, F. and Segev, N.** (1999). Genetic interactions in yeast between Ypt GTPases and Arf guanine nucleotide exchangers. *Genetics* **152**, 1543-56.
- Karrenbauer, A., Jeckel, D., Just, W., Birk, R., Schmidt, R. R., Rothman, J. E. and Wieland, F. T.** (1990). The rate of bulk flow from the Golgi to the plasma membrane. *Cell* **63**, 259-67.
- Kauppi, M., Simonsen, A., Bremnes, B., Vieira, A., Callaghan, J., Stenmark, H. and Olkkonen, V. M.** (2002). The small GTPase Rab22 interacts with EEA1 and controls endosomal membrane trafficking. *J Cell Sci* **115**, 899-911.

- Kawamoto, K., Yoshida, Y., Tamaki, H., Torii, S., Shinotsuka, C., Yamashina, S. and Nakayama, K.** (2002). GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic* **3**, 483-95.
- Kitt, K. N., Hernandez-Deviez, D., Ballantyne, S. D., Spiliotis, E. T., Casanova, J. E. and Wilson, J. M.** (2008). Rab14 regulates apical targeting in polarized epithelial cells. *Traffic* **9**, 1218-31.
- Leabu, M.** (2006). Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms. *J Cell Mol Med* **10**, 423-7.
- Lippincott-Schwartz, J. and Liu, W.** (2006). Insights into COPI coat assembly and function in living cells. *Trends Cell Biol* **16**, e1-4.
- Lippincott-Schwartz, J., Presley, J. F., Zaal, K. J., Hirschberg, K., Miller, C. D. and Ellenberg, J.** (1999). Monitoring the dynamics and mobility of membrane proteins tagged with green fluorescent protein. *Methods Cell Biol* **58**, 261-81.
- Lippincott-Schwartz, J. and Smith, C. L.** (1997). Insights into secretory and endocytic membrane traffic using green fluorescent protein chimeras. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 631-9.
- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M. A., Goda, Y., Zerial, M. and Pfeffer, S. R.** (1993). Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *Embo J* **12**, 677-82.
- Lowe, M., Nakamura, N. and Warren, G.** (1998). Golgi division and membrane traffic. *Trends Cell Biol* **8**, 40-4.
- Lucocq, J. M., Berger, E. G. and Warren, G.** (1989). Mitotic Golgi fragments in HeLa cells and their role in the reassembly pathway. *J Cell Biol* **109**, 463-74.
- Lupas, A. N. and Martin, J.** (2002). AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 746-53.
- Lutcke, A., Jansson, S., Parton, R. G., Chavrier, P., Valencia, A., Huber, L. A., Lehtonen, E. and Zerial, M.** (1993). Rab17, a novel small GTPase, is specific for epithelial cells and is induced during cell polarization. *J Cell Biol* **121**, 553-64.
- Lutcke, A., Olkkonen, V. M., Dupree, P., Lutcke, H., Simons, K. and Zerial, M.** (1995). Isolation of a murine cDNA clone encoding Rab19, a novel tissue-specific small GTPase. *Gene* **155**, 257-60.
- Magadan, J. G., Barbieri, M. A., Mesa, R., Stahl, P. D. and Mayorga, L. S.** (2006). Rab22a regulates the sorting of transferrin to recycling endosomes. *Mol Cell Biol* **26**, 2595-614.

**Maltese, W. A., Soule, G., Gunning, W., Calomeni, E. and Alexander, B.** (2002). Mutant Rab24 GTPase is targeted to nuclear inclusions. *BMC Cell Biol* **3**, 25.

**Marra, P., Salvatore, L., Mironov, A., Jr., Di Campli, A., Di Tullio, G., Trucco, A., Beznoussenko, G., Mironov, A. and De Matteis, M. A.** (2007). The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. *Mol Biol Cell* **18**, 1595-608.

**Martinez, O. and Goud, B.** (1998). Rab proteins. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 101-12.

**Martinez, O., Schmidt, A., Salamero, J., Hoflack, B., Roa, M. and Goud, B.** (1994). The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport. *J Cell Biol* **127**, 1575-88.

**Marzesco, A. M., Dunia, I., Pandjaitan, R., Recouvreur, M., Dauzonne, D., Benedetti, E. L., Louvard, D. and Zahraoui, A.** (2002). The small GTPase Rab13 regulates assembly of functional tight junctions in epithelial cells. *Mol Biol Cell* **13**, 1819-31.

**Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R. and Yeung, T.** (1998). COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* **93**, 263-75.

**Meresse, S., Gorvel, J. P. and Chavrier, P.** (1995). The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci* **108 ( Pt 11)**, 3349-58.

**Mesa, R., Magadan, J., Barbieri, A., Lopez, C., Stahl, P. D. and Mayorga, L. S.** (2005). Overexpression of Rab22a hampers the transport between endosomes and the Golgi apparatus. *Exp Cell Res* **304**, 339-53.

**Mesa, R., Salomon, C., Roggero, M., Stahl, P. D. and Mayorga, L. S.** (2001). Rab22a affects the morphology and function of the endocytic pathway. *J Cell Sci* **114**, 4041-9.

**McMahon, H. T. and Mills, I. G.** (2004). COP and clathrin-coated vesicle budding: different pathways, common approaches. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 379-91.

**Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F. et al.** (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* **25**, 173-6.

**Mironov, A. A., Beznoussenko, G. V., Nicoziani, P., Martella, O., Trucco, A., Kweon, H. S., Di Giandomenico, D., Polishchuk, R. S., Fusella, A., Lupetti, P. et al.** (2001). Small cargo proteins and

large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae. *J Cell Biol* **155**, 1225-38.

**Mironov, A. A., Beznoussenko, G. V., Polishchuk, R. S. and Trucco, A.** (2005). Intra-Golgi transport: a way to a new paradigm? *Biochim Biophys Acta* **1744**, 340-50.

**Monetta, P., Slavin, I., Romero, N. and Alvarez, C.** (2007). Rab1b interacts with GBF1 and modulates both ARF1 dynamics and COPI association. *Mol Biol Cell* **18**, 2400-10.

**Moyer, B. D., Allan, B. B. and Balch, W. E.** (2001). Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering. *Traffic* **2**, 268-76.

**Munafò, D. B. and Colombo, M. I.** (2002). Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24. *Traffic* **3**, 472-82.

**Nakatsu, F. and Ohno, H.** (2003). Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct* **28**, 419-29.

**Nashida, T., Imai, A. and Shimomura, H.** (2006). Relation of Rab26 to the amylase release from rat parotid acinar cells. *Arch Oral Biol* **51**, 89-95.

**Nie, Z., Hirsch, D. S. and Randazzo, P. A.** (2003). Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 396-404.

**Niu, T. K., Pfeifer, A. C., Lippincott-Schwartz, J. and Jackson, C. L.** (2005). Dynamics of GBF1, a Brefeldin A-sensitive Arf1 exchange factor at the Golgi. *Mol Biol Cell* **16**, 1213-22.

**Nokes, R. L., Fields, I. C., Collins, R. N. and Folsch, H.** (2008). Rab13 regulates membrane trafficking between TGN and recycling endosomes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **182**, 845-53.

**Novick, P., Field, C. and Schekman, R.** (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**, 205-15.

**Nuoffer, C., Davidson, H. W., Matteson, J., Meinkoth, J. and Balch, W. E.** (1994). A GDP-bound form of rab1 inhibits protein export from the endoplasmic reticulum and transport between Golgi compartments. *J Cell Biol* **125**, 225-37.

**Oberhauser, A. F., Monck, J. R., Balch, W. E. and Fernandez, J. M.** (1992). Exocytotic fusion is activated by Rab3a peptides. *Nature* **360**, 270-3.

- Olkkonen, V. M., Dupree, P., Killisch, I., Lutcke, A., Zerial, M. and Simons, K.** (1993). Molecular cloning and subcellular localization of three GTP-binding proteins of the rab subfamily. *J Cell Sci* **106 ( Pt 4)**, 1249-61.
- Opdam, F. J., Kamps, G., Croes, H., van Bokhoven, H., Ginsel, L. A. and Fransen, J. A.** (2000). Expression of Rab small GTPases in epithelial Caco-2 cells: Rab21 is an apically located GTP-binding protein in polarised intestinal epithelial cells. *Eur J Cell Biol* **79**, 308-16.
- Ozeki, S., Cheng, J., Tauchi-Sato, K., Hatano, N., Taniguchi, H. and Fujimoto, T.** (2005). Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci* **118**, 2601-11.
- Patterson, G. H., Hirschberg, K., Polishchuk, R. S., Gerlich, D., Phair, R. D. and Lippincott-Schwartz, J.** (2008). Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* **133**, 1055-67.
- Pearse, B. M. and Robinson, M. S.** (1990). Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 151-71.
- Pellinen, T., Arjonen, A., Vuoriluoto, K., Kallio, K., Fransen, J. A. and Ivaska, J.** (2006). Small GTPase Rab21 regulates cell adhesion and controls endosomal traffic of beta1-integrins. *J Cell Biol* **173**, 767-80.
- Pellinen, T., Tuomi, S., Arjonen, A., Wolf, M., Edgren, H., Meyer, H., Grosse, R., Kitzing, T., Rantala, J. K., Kallioniemi, O. et al.** (2008). Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Dev Cell* **15**, 371-85.
- Pepperkok, R., Whitney, J. A., Gomez, M. and Kreis, T. E.** (2000). COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo. *J Cell Sci* **113**, 135-44.
- Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C.** (2000). The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J Mol Biol* **301**, 1077-87.
- Pfeffer, S. and Aivazian, D.** (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 886-96.

- Pfeffer, S. R.** (2001). Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol* **11**, 487-91.
- Pfeffer, S. R., Dirac-Svejstrup, A. B. and Soldati, T.** (1995). Rab GDP dissociation inhibitor: putting rab GTPases in the right place. *J Biol Chem* **270**, 17057-9.
- Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J. and Lippincott-Schwartz, J.** (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**, 81-5.
- Presley, J. F., Ward, T. H., Pfeifer, A. C., Siggia, E. D., Phair, R. D. and Lippincott-Schwartz, J.** (2002). Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature* **417**, 187-93.
- Ramaen, O., Joubert, A., Simister, P., Belgareh-Touze, N., Olivares-Sanchez, M. C., Zeeh, J. C., Chantalat, S., Golinelli-Cohen, M. P., Jackson, C. L., Biou, V. et al.** (2007). Interactions between conserved domains within homodimers in the BIG1, BIG2, and GBF1 Arf guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* **282**, 28834-42.
- Randazzo, P. A., Nie, Z., Miura, K. and Hsu, V. W.** (2000). Molecular aspects of the cellular activities of ADP-ribosylation factors. *Sci STKE* **2000**, RE1.
- Rodriguez-Boulan, E. and Musch, A.** (2005). Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 455-64.
- Rothman, J. E.** (1996). The protein machinery of vesicle budding and fusion. *Protein Sci* **5**, 185-94.
- Rothman, J. E. and Wieland, F. T.** (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-34.
- Salminen, A. and Novick, P. J.** (1987). A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* **49**, 527-38.
- Satoh, A., Wang, Y., Malsam, J., Beard, M. B. and Warren, G.** (2003). Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure. *Traffic* **4**, 153-61.
- Schekman, R. and Orci, L.** (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-33.
- Schuck, S., Gerl, M. J., Ang, A., Manninen, A., Keller, P., Mellman, I. and Simons, K.** (2007). Rab10 is involved in basolateral transport in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Traffic* **8**, 47-60.

- Schwaninger, R., Plutner, H., Bokoch, G. M. and Balch, W. E.** (1992). Multiple GTP-binding proteins regulate vesicular transport from the ER to Golgi membranes. *J Cell Biol* **119**, 1077-96.
- Schwartz, S. L., Cao, C., Pylypenko, O., Rak, A. and Wandinger-Ness, A.** (2007). Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* **120**, 3905-10.
- Schweizer, A., Fransen, J. A., Bachi, T., Ginsel, L. and Hauri, H. P.** (1988). Identification, by a monoclonal antibody, of a 53-kD protein associated with a tubulo-vesicular compartment at the cis-side of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **107**, 1643-53.
- Seabra, M. C., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1993). Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science* **259**, 377-81.
- Seabra, M. C., Goldstein, J. L., Sudhof, T. C. and Brown, M. S.** (1992). Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *J Biol Chem* **267**, 14497-503.
- Seabra, M. C. and Wasmeier, C.** (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 451-7.
- Segev, N.** (2001a). Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 500-11.
- Segev, N.** (2001b). Ypt/rab gtpases: regulators of protein trafficking. *Sci STKE* **2001**, RE11.
- Simpson, J. C., Griffiths, G., Wessling-Resnick, M., Fransen, J. A., Bennett, H. and Jones, A. T.** (2004). A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* **117**, 6297-311.
- Shimada, K., Uzawa, K., Kato, M., Endo, Y., Shiiba, M., Bukawa, H., Yokoe, H., Seki, N. and Tanzawa, H.** (2005). Aberrant expression of RAB1A in human tongue cancer. *Br J Cancer* **92**, 1915-21.
- Shorter, J. and Warren, G.** (2002). Golgi architecture and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 379-420.
- Simmen, T., Honing, S., Icking, A., Tikkanen, R. and Hunziker, W.** (2002). AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* **4**, 154-9.
- Singer-Kruger, B., Stenmark, H. and Zerial, M.** (1995). Yeast Ypt51p and mammalian Rab5: counterparts with similar function in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* **108 ( Pt 11)**, 3509-21.

- Sonnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jamsa, E., Dirac-Svejstrup, B. and Warren, G.** (1998). A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* **140**, 1013-21.
- Stenmark, H. and Olkkonen, V. M.** (2001). The Rab GTPase family. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3007.
- Stenmark, H., Valencia, A., Martinez, O., Ullrich, O., Goud, B. and Zerial, M.** (1994). Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *Embo J* **13**, 575-83.
- Stephens, D. J., Lin-Marq, N., Pagano, A., Pepperkok, R. and Paccaud, J. P.** (2000). COPI-coated ER-to-Golgi transport complexes segregate from COPII in close proximity to ER exit sites. *J Cell Sci* **113**, 2177-85.
- Styers, M. L., Kowalczyk, A. P. and Faundez, V.** (2006). Architecture of the vimentin cytoskeleton is modified by perturbation of the GTPase ARF1. *J Cell Sci* **119**, 3643-54.
- Szul, T., Garcia-Mata, R., Brandon, E., Shestopal, S., Alvarez, C. and Sztul, E.** (2005). Dissection of membrane dynamics of the ARF-guanine nucleotide exchange factor GBF1. *Traffic* **6**, 374-85.
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T.** (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* **81**, 153-208.
- Tisdale, E. J. and Balch, W. E.** (1996). Rab2 is essential for the maturation of pre-Golgi intermediates. *J Biol Chem* **271**, 29372-9.
- Touchot, N., Chardin, P. and Tavitian, A.** (1987). Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8210-4.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S. and Walter, P.** (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-58.
- Urbe, S., Huber, L. A., Zerial, M., Tooze, S. A. and Parton, R. G.** (1993). Rab11, a small GTPase associated with both constitutive and regulated secretory pathways in PC12 cells. *FEBS Lett* **334**, 175-82.
- van der Sluijs, P., Hull, M., Webster, P., Male, P., Goud, B. and Mellman, I.** (1992). The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* **70**, 729-40.
- Vasudevan, C., Han, W., Tan, Y., Nie, Y., Li, D., Shome, K., Watkins, S. C., Levitan, E. S. and**



**Romero, G.** (1998). The distribution and translocation of the G protein ADP-ribosylation factor 1 in live cells is determined by its GTPase activity. *J Cell Sci* **111 ( Pt 9)**, 1277-85.

**Verhoeven, K., De Jonghe, P., Coen, K., Verpoorten, N., Auer-Grumbach, M., Kwon, J. M., FitzPatrick, D., Schmedding, E., De Vriendt, E., Jacobs, A. et al.** (2003). Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* **72**, 722-7.

**Volpicelli-Daley, L. A., Li, Y., Zhang, C. J. and Kahn, R. A.** (2005). Isoform-selective effects of the depletion of ADP-ribosylation factors 1-5 on membrane traffic. *Mol Biol Cell* **16**, 4495-508.

**Wang, Y., Ng, E. L. and Tang, B. L.** (2006). Rab23: what exactly does it traffic? *Traffic* **7**, 746-50.

**Ward, T. H., Polishchuk, R. S., Caplan, S., Hirschberg, K. and Lippincott-Schwartz, J.** (2001). Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J Cell Biol* **155**, 557-70.

**Weide, T., Bayer, M., Koster, M., Siebrasse, J. P., Peters, R. and Barnekow, A.** (2001). The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b. *EMBO Rep* **2**, 336-41.

**Weide, T., Teuber, J., Bayer, M. and Barnekow, A.** (2003). MICAL-1 isoforms, novel rab1 interacting proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 79-86.

**Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J.** (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**, 843-6.

**Whyte, J. R. and Munro, S.** (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci* **115**, 2627-37.

**Wilcke, M., Johannes, L., Galli, T., Mayau, V., Goud, B. and Salamero, J.** (2000). Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-golgi network. *J Cell Biol* **151**, 1207-20.

**Wild, K., Halic, M., Sinning, I. and Beckmann, R.** (2004). SRP meets the ribosome. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1049-53.

**Wilson, A. L., Erdman, R. A. and Maltese, W. A.** (1996). Association of Rab1B with GDP-dissociation inhibitor (GDI) is required for recycling but not initial membrane targeting of the Rab protein. *J Biol Chem* **271**, 10932-40.

**Wilson, B. S., Nuoffer, C., Meinkoth, J. L., McCaffery, M., Feramisco, J. R., Balch, W. E. and Farquhar, M. G.** (1994). A Rab1 mutant affecting guanine nucleotide exchange promotes disassembly of the Golgi apparatus. *J Cell Biol* **125**, 557-71.

**Williams, D. B.** (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* **119**, 615-23.

**Wu, G.** (2008). Regulation of the trafficking and function of G protein-coupled receptors by Rab1 GTPase in cardiomyocytes. *Methods Enzymol* **438**, 227-38.

**Xiang, Y., Seemann, J., Bisel, B., Punthambaker, S. and Wang, Y.** (2007). Active ADP-ribosylation factor-1 (ARF1) is required for mitotic Golgi fragmentation. *J Biol Chem* **282**, 21829-37.

**Yang, L., Clinton, J. M., Blackburn, M. L., Zhang, Q., Zou, J., Zielinska-Kwiatkowska, A., Tang, B. L. and Chansky, H. A.** (2008). Rab23 regulates differentiation of ATDC5 chondroprogenitor cells. *J Biol Chem* **283**, 10649-57.

**Yoshie, S., Imai, A., Nashida, T. and Shimomura, H.** (2000). Expression, characterization, and localization of Rab26, a low molecular weight GTP-binding protein, in the rat parotid gland. *Histochem Cell Biol* **113**, 259-63.

**Zacchi, P., Stenmark, H., Parton, R. G., Orioli, D., Lim, F., Giner, A., Mellman, I., Zerial, M. and Murphy, C.** (1998). Rab17 regulates membrane trafficking through apical recycling endosomes in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **140**, 1039-53.

**Zerial, M.** (1993). Regulation of endocytosis by the small GTP-ase rab5. *Cytotechnology* **11 Suppl 1**, S47-9.

**Zerial, M. and McBride, H.** (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 107-17.

**Zerial, M.** (1993). Regulation of endocytosis by the small GTP-ase rab5. *Cytotechnology* **11 Suppl 1**, S47-9.

**Zheng, J. Y., Koda, T., Fujiwara, T., Kishi, M., Ikehara, Y. and Kakinuma, M.** (1998). A novel Rab GTPase, Rab33B, is ubiquitously expressed and localized to the medial Golgi cisternae. *J Cell Sci* **111 ( Pt 8)**, 1061-9.

**Zuk, P. A. and Elferink, L. A.** (1999). Rab15 mediates an early endocytic event in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **274**, 22303-12