

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DE LA GTPasa RAB18 EN EL TRÁFICO INTRACELULAR Y LA FISIOLOGÍA CELULAR

Memoria de Tesis Doctoral presentada por **Farid Almabouada**,
Ingeniero Biólogo, para optar al grado de **Doctor en Ciencias**.

Los Directores

Dra. María del Mar Malagón Poyato
Catedrática de Biología Celular de la
Universidad de Córdoba

Dr. Rafael Vázquez Martínez
Profesor Titular de Biología Celular de la
Universidad de Córdoba

En Córdoba, a 15 de Junio de 2013

TITULO: *MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DE LA GTPasa RAB18
EN EL TRAFICO INTRACELULAR Y LA FISIOLÓGIA CELULAR*

AUTOR: *FARID ALMABOUADA*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DE LA GTPasa RAB18 EN EL TRÁFICO INTRACELULAR Y LA FISIOLOGÍA CELULAR
DOCTORANDO/A: Farid Almabouada

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, el doctorando Farid Almabouada no sólo ha superado con creces los objetivos planteados al comienzo de la misma, sino que ha desarrollado y validado un número importante de técnicas experimentales de una gran utilidad para el grupo de investigación, que le han permitido obtener resultados muy relevantes en el campo de la regulación de la secreción hormonal en células neuroendocrinas, utilizando como modelo de estudio uno de los miembros de la familia de GTPasas de bajo peso molecular implicadas en el control del tráfico intracelular, Rab18. Además de los estudios de investigación básica realizados por D. Farid Almabouada, en el transcurso de la Tesis Doctoral se han realizado análisis de expresión génica de dicha proteína en muestras de tumores de origen en la cresta neural, feocromocitomas y para gangliomas, lo que ha proporcionado un interés traslacional a la investigación realizada. El trabajo realizado, que se incluye en las 39 Figuras y las 4 Tablas de resultados que se incluyen en el manuscrito, se está preparando en la actualidad para someterlo en una revista de alto impacto dentro del área de Biología Celular. Por otra parte, como resultado del trabajo realizado por D. Farid Almabouada en la preparación y optimización de una técnica que ha resultado fundamental para la investigación llevada a cabo en la presente Tesis Doctoral, la técnica de Förster/Fluorescence resonance energy transfer, se ha publicado un artículo original en una revista reconocida en el área de la Bioquímica/Biología Molecular, The Journal of Biological Chemistry, en la que firma como primer autor. Adicionalmente, D. Farid Almabouada ha participado de forma activa en la redacción de una revisión invitada sobre Rab18 realizada por el grupo de investigación, y ha contribuido de forma fundamental a la caracterización de esta proteína en otros modelos celulares, que ha dado lugar igualmente a la publicación de un artículo de investigación.

Por último, el doctorando ha presentado sus resultados en diferentes congresos de ámbito nacional (5 comunicaciones tipo Póster y 1 Oral), y en congresos de ámbito internacional (4 comunicaciones tipo Póster y 1 Conferencia Invitada).

Por todo ello, se solicita la autorización para la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 15 de Junio de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo. Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato

Fdo.: Prof. Dr. Rafael Vázquez Martínez



UNIVERSIDAD DE CORDOBA

DPTO DE BIOLOGÍA CELULAR,
FISIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



D^a María del Mar Malagón Poyato (Catedrática de Biología Celular), y **D. Rafael Vázquez Martínez** (Profesor Titular de Biología Celular), ambos pertenecientes al Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba,

INFORMAN

Que D. **Farid Almabouada**, Ingeniero Biólogo, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado “MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DE LA GTPasa RAB18 EN EL TRÁFICO INTRACELULAR Y LA FISIOLOGÍA CELULAR” y que bajo nuestro juicio reúne los méritos suficientes para optar al Grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, firmamos la presente en Córdoba, a 4 de Abril de 2011.

Córdoba, 15 de Junio de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo. Prof. Dra. María del Mar Malagón Poyato

Fdo.: Prof. Dr. Rafael Vázquez Martínez

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1- La ruta de secreción regulada.....	2
1.1.1.- Consideraciones generales.....	2
1.1.2.- El retículo endoplasmático.....	5
1.1.3.- El complejo de Golgi.....	7
1.1.3.1.- Modificaciones post-traduccionales de proteínas en el complejo de Golgi.....	9
1.1.3.1.1.- Glucosilación.....	9
1.1.3.1.2.- O-Fosforilación.....	10
1.1.3.1.3.- Sulfatación.....	10
1.1.3.1.4.- Procesamiento proteolítico de precursores de proteínas.....	10
1.1.4.- Clasificación de proteínas de secreción.....	11
1.1.5. Gránulos de secreción inmaduros.....	14
1.1.6.- Clasificación y destino de las proteínas.....	16
1.1.7.- Tráfico post-Golgi de gránulos de secreción.....	18
1.1.8.- Amarre (<i>tethering</i>), anclaje (<i>docking</i>) y fusión de gránulos de secreción con la membrana plasmática.....	19
1.2.- La familia de GTPasas Rab.....	21
1.2.1.- Consideraciones generales.....	21
1.2.2.- Características estructurales y funcionales de las proteínas Rab.....	23
1.2.3.- Características estructurales y funcionales de Rab18.....	30
1.2.4.- Las proteínas Rab en enfermedades humanas.....	34
2.- OBJETIVOS.....	38
3.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
3.1. Material biológico.....	41
3.1.1. Animales y obtención de tejidos.....	41
3.1.2. Líneas y cultivos celulares.....	41
3.1.2.1. Transfección de cultivos celulares.....	42
3.2. Estudios de localización intracelular mediante microscopía de fluorescencia.....	42
3.3. Estudios de movimiento intracelular mediante video microscopía de fluorescencia en tiempo real.....	44
3.4. Estudios bioquímicos mediante <i>Western blotting</i>.....	45
3.4.1. Obtención de extractos proteicos.....	45
3.4.2. Fraccionamiento proteico mediante centrifugación.....	45
3.4.3. Precipitación de proteínas mediante el método Cloroformo/ Metanol.....	46
3.4.4. Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia.....	46
3.4.5. Inmunodetección y análisis densitométrico.....	47
3.5. Estudios de clonación y expresión.....	48
3.5.1. Obtención de ácidos nucleicos.....	48
3.5.2. Retrotranscripción de ARN total.....	49
3.5.3. Diseño de oligonucleótidos.....	49
3.5.4. Clonación de DBNDD2 de rata.....	50
3.5.5. Clonación de la secuencia codificante del gen GDI2 humano en vectores eucariotas.....	50
3.5.6. Clonación de proteínas en vectores reporteros.....	51
3.5.7. Purificación de productos de PCR o de ADN plasmídico.....	51
3.5.8. Digestión enzimática y ligación.....	52
3.5.9. Preparación y transformación de bacterias competentes.....	52
3.5.10. Secuenciación.....	53

3.5.11. Análisis general de secuencias.....	53
3.6. Ensayos de interacción proteína-proteína para la determinación de proteínas efectoras de Rab18.....	54
3.7. Metodología de Förster Resonance Energy Transfer (FRET).....	54
3.7.1. Metodología de FRET en células fijadas.....	54
3.7.2. Medidas de FRET a tiempo real.....	57
3.8. Ensayos de co-inmunoprecipitación.....	58
3.9. Estudios de cromatografía líquida (FPLC; Fast Protein Liquid Chromatography).....	59
3.10. Ensayos de doble híbrido en levaduras.....	61
3.10.1. Clonación de la secuencia codificante del gen Rab18 de ratón en el vector de expresión de levaduras.....	62
3.10.2. Clonación de la secuencia del mutante activo de Rab18 de ratón; Rab18(Q67L).....	62
3.10.3. Transformación de levaduras.....	65
3.10.4. Control de toxicidad de Rab18 para las cepas Y187.....	67
3.10.5. Control de la activación transcripcional de Rab18.....	67
3.10.6. Análisis de la sobreexpresión de Rab18 en la cepa Y187.....	67
3.10.7. Emparejamiento de la cepa Y187 [pGBKT7-Rab18] con una librería de cDNA de cerebro.....	68
3.10.8. Screening de las colonias positivas por PCR.....	69
3.11. Análisis estadístico.....	70
4.- RESULTADOS.....	71
4.1.- Rab18 modifica la dinámica de movimiento de los gránulos de secreción en respuesta a estímulos extracelulares.....	72
4.2.- La movilidad de los gránulos de secreción que presentan Rab18 depende de la red de citoesqueleto de microtúbulos.....	75
4.3.- Rab18 interacciona con la proteína motora quinesina-1 y con huntingtina.....	79
4.4.- La interacción de Rab18 con quinesina-1 inhibe la capacidad de movimiento de la proteína motora.....	86
4.5.- Búsqueda de otras proteínas de interacción con Rab18 en células neuroendocrinas.	89
4.5.1.- Inmunoprecipitación.....	89
4.5.2.- <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> (FPLC).....	95
4.5.3.- Ensayo de Doble Híbrido de Levadura (<i>Yeast Two-Hybrid screen</i> ; Y2H).....	96
4.5.4.- Localización subcelular de posibles efectores de Rab18.....	99
4.6.- Rab18 en feocromocitomas humanos.....	103
5.- DISCUSIÓN.....	107
5.1.- Regulación de la actividad de Rab18.....	108
5.2.- Acción de Rab18 sobre el complejo motor dependiente de microtúbulos.....	113
5.3.- Interacción de Rab18 con gránulos de secreción inmaduros en las etapas tempranas de la ruta de secreción regulada.....	117

5.4.- Rab18 y proteínas relacionadas en feocromocitomas.....	121
5.5.- Consideraciones finales.....	124
6.- CONCLUSIONES.....	125
7.- REFERENCIAS.....	127

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- LA RUTA DE SECRECIÓN REGULADA

1.1.1.- Consideraciones generales

La ruta secretora es un proceso complejo que comprende numerosas etapas que se suceden de manera secuencial, desde la síntesis de las proteínas que van a ser secretadas, su maduración post-traducciona, su clasificación en vesículas de secreción y su envío controlado hacia la superficie celular (Bonifacino y Glick, 2004). Las proteínas que son transportadas a lo largo de la ruta secretora son sintetizadas por ribosomas asociados a las membranas del retículo endoplasmático (RE) y translocadas al lumen de este orgánulo de una manera co-traducciona. Una vez en el RE, las proteínas de secreción se pliegan adquiriendo su conformación terciaria funcional, se clasifican y se empaquetan en vesículas de transporte que pasan a través del compartimento intermediario Golgi-RE (ERGIC), hasta alcanzar las cisternas *cis* del complejo de Golgi. En las cisternas más distales de este orgánulo, la red *trans* del Golgi (TGN), las proteínas son clasificadas de nuevo y empaquetadas en diferentes tipos de vesículas de acuerdo al destino final de cada proteína *cargo* (Gerdes, 2008). Algunas proteínas son transportadas a través de la ruta de secreción constitutiva, que es común para todos los tipos celulares y responsable del continuo aporte de componentes proteicos y lipídicos a la membrana plasmática y a la matriz extracelular. La ruta de secreción regulada es una característica única de células especializadas en secreción, como las células endocrinas y las neuronas. Estos tipos celulares forman y acumulan vesículas o gránulos de secreción que contienen una carga específica de proteínas de secreción y que serán liberadas al espacio extracelular de una manera regulada en respuesta a la estimulación de receptores de superficie (Park y Loh, 2008). Además de la ruta exocítica, las células disponen de un sistema de endocitosis que converge con las rutas secretoras a nivel de la red *trans* del Golgi. En la ruta endocítica, diferentes moléculas extracelulares y componentes de la membrana plasmática son internalizados en vesículas de endocitosis y transportados a endosomas tempranos, donde el contenido de las vesículas sufre una extensa clasificación. A partir de este compartimento, las moléculas endocitadas pueden ser recicladas a la membrana plasmática, como ocurre con multitud de receptores de superficie, transportadas a la red *trans* del Golgi, o dirigidas a lisosomas vía endosomas tardíos para su degradación (Seaman, 2008). La Figura 1 resume las distintas rutas intracelulares que las vesículas derivadas de diferentes compartimentos

pueden seguir y los componentes moleculares que recubren su superficie y que les confieren identidad en las etapas tempranas del ciclo de vida de dichas vesículas.

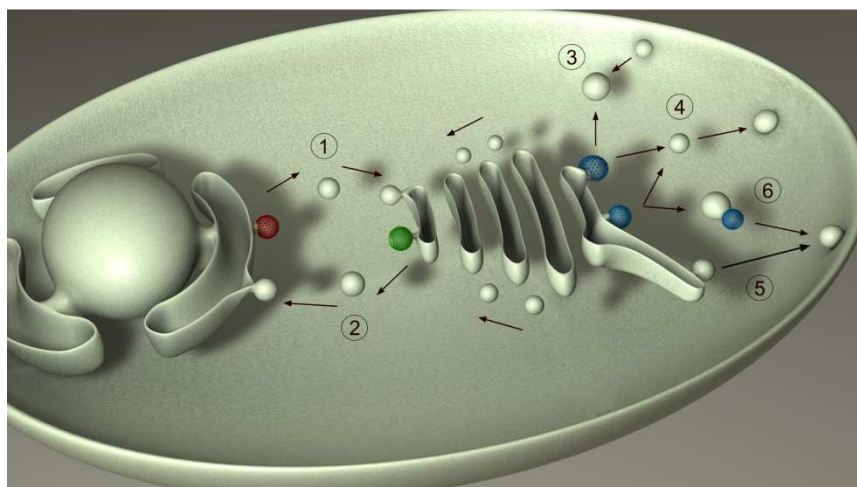


Figura 1: La ruta secretora y el tráfico intracelular de vesículas. La imagen representa las rutas intracelulares dependientes de vesículas más importantes que siguen los péptidos de secreción, desde su síntesis asociada al RE hasta su llegada a la membrana plasmática. (1) Tras su síntesis, los péptidos de secreción se empaquetan en vesículas recubiertas de COPII (rojo) que derivan de la membrana de RE. Las vesículas COPII descargan su contenido en el compartimento ERGIC, desde donde son dirigidas hacia las cisternas más distales o *trans* del complejo de Golgi. (2) Los receptores encargados de la clasificación de proteínas en el RE y aquellas proteínas residentes en el RE que han sido erróneamente dirigidas al ERGIC son recicladas de vuelta al RE en vesículas recubiertas de COPI (verde). Una vez en el TGN, las proteínas son clasificadas en subdominios específicos de este compartimento. (3) Por una parte, las enzimas hidrolíticas lisosomales son empaquetadas en vesículas recubiertas de clatrina (azul), que son transportadas y fusionadas con endosomas tardíos. (4) Otras vesículas recubiertas de clatrina derivadas del TGN se cargan con péptidos de secreción (gránulos de secreción inmaduros), los cuales sufren procesamiento y agregación hasta dar lugar a gránulos de secreción maduros, un distintivo de las células neuroendocrinas. Tras la llegada de un estímulo extracelular, estos gránulos se fusionan con la membrana plasmática y liberan su contenido en un proceso conocido como secreción regulada. (5) Por otra parte, los componentes moleculares de la matriz extracelular son empaquetados en vesículas carentes de cubierta que son dirigidas hacia la superficie celular de una manera constitutiva (ruta secretora constitutiva). (6) Además, se ha propuesto la existencia de compartimentos intermedios en los cuales las rutas de secreción regulada y constitutiva divergen en base a la capacidad de las proteínas de secreción de clasificarse por agregación. En este caso, las proteínas de la ruta de secreción constitutiva se empaquetarían en vesículas recubiertas de clatrina en un proceso conocido como *constitutive-like secretion*. Tomado de Vázquez-Martínez *et al.*, Gen. Comp. Endocrinol. 2012.

Las vesículas de transporte median la mayor parte de la transferencia de proteínas entre los diferentes compartimentos de la ruta secretora. Este proceso comprende varias etapas secuenciales: en primer lugar, los complejos de cubierta (*coat complexes*) son los responsables de la formación de las vesículas de transporte, lo que ocurre como consecuencia de la evaginación y fisión de parte de la membrana del compartimento donador, así como de la incorporación específica del *cargo* en las vesículas de nueva formación (Brett y Traub, 2006). Tras la pérdida de la cubierta proteica, las vesículas son transportadas hacia el compartimento aceptor, normalmente gracias a su asociación a proteínas motoras que interaccionan y se mueven a lo largo

de las redes del citoesqueleto celular (Brett y Traub, 2006). Cerca del compartimento aceptor, las vesículas se fijan de manera transitoria a la membrana aceptora gracias a la ayuda de complejos multimoleculares en un proceso conocido como *tethering*. Finalmente, las vesículas se anclan y fusionan con la membrana aceptora permitiendo así la descarga de su contenido al compartimento aceptor. Todos estos procesos se encuentran estrechamente controlados por un número importante de proteínas que aseguran la eficiencia y especificidad de la selección del *cargo*, así como la dirección de movimiento de las vesículas y su fusión con membranasceptoras específicas.

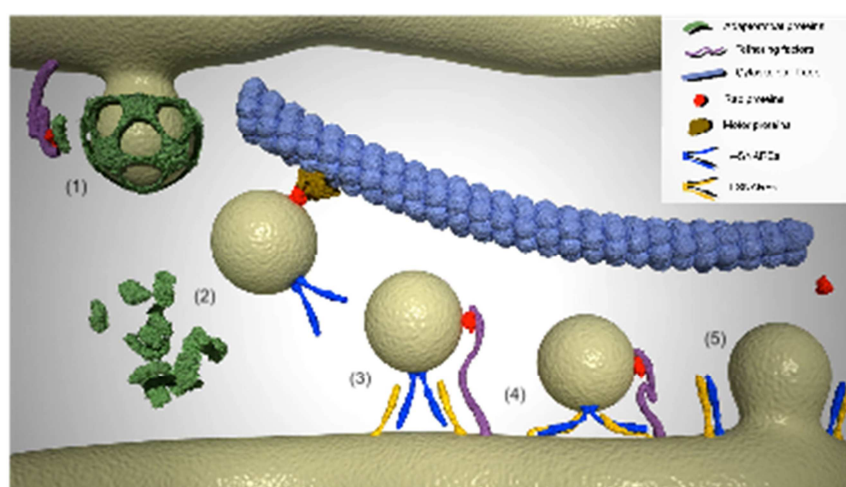


Figura 2: Ciclo de vida de una vesícula de transporte intracelular desde su evaginación a partir del compartimento donador hasta su fusión con la membrana del compartimento aceptor. (1) Formación de la vesícula y comienzo del ensamblaje de las proteínas adaptadoras y de cubierta. Proteínas GTPasas Rab específicas interaccionan con factores de *tethering* que se encuentran anclados a la membrana del compartimento donador para formar los denominados *multi-subunit Rab tethers*, los cuales reclutan a las proteínas de cubierta como COPI, COPII y clatrina, así como a las proteínas adaptadoras hacia la superficie de la vesícula en formación, lo que confiere a la vesícula naciente especificidad en la selección del cargo. (2) Pérdida de la cubierta proteica y transporte específico de las vesículas a lo largo de la red del citoesqueleto celular. Las vesículas de nueva formación pierden su cubierta mediante la inactivación de proteínas Rab particulares y la activación de enzimas de *uncoating*. Los complejos proteicos motores reconocen y reclutan las vesículas desprovistas de cubierta hacia los filamentos de citoesqueleto para transportar la proteína cargo hacia el compartimento correspondiente. Estos complejos motores incluyen proteínas Rab que modulan la procesividad y dirección del movimiento de las proteínas motoras. Durante el transporte, complejos v-SNARE específicos son añadidos a la superficie de las vesículas, lo que confiere a éstas especificidad para su fusión con la membrana del compartimento diana. (3) Amarre o *tethering* de las vesículas al compartimento aceptor. Las vesículas próximas al compartimento diana se amarran a su membrana en un proceso controlado por complejos proteicos compuestos por proteínas Rab y factores de *tethering*. (4) Anclaje o *docking* de las vesículas al compartimento aceptor. Los complejos v-SNARE se ensamblan con complejos t-SNARE específicos presentes en la membrana del compartimento aceptor, formando un haz de cuatro hélices (complejos *trans*-SNARE), lo que permite el acercamiento de las vesículas a la membrana diana. (5) Fusión de membranas y liberación del cargo en el compartimento aceptor. Los complejos *trans*-SNARE promueven la fusión de la vesícula con la bicapa lipídica del compartimento aceptor. La carga de la vesícula es transferida a dicho compartimento y los complejos SNARE son reciclados. Las proteínas Rab implicadas son inactivadas y devueltas al citosol, donde permanecen inactivas hasta que se inicie un nuevo ciclo de activación. Tomado de Vázquez-Martínez y Malagón, *Front. Neuroendocrin. Sci.* 2011.

Entre estas proteínas, se encuentran, entre otros, los factores de *tethering*, los complejos v-SNARE y t-SNARE y las proteínas Rab GTPasas (Figura 2) (Bonifacino y Glick, 2004; Jahn y Scheller, 2006; Takamori *et al.*, 2006).

1.1.2.- El retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es el punto de entrada de las proteínas que trafican a través de la ruta secretora. En células endocrinas, estas proteínas se sintetizan generalmente como polipéptidos precursores inactivos (prohormonas) que son activados posteriormente mediante proteólisis gracias a la acción de diversas proteínas convertidas de prohormonas. En el lumen del RE, las proteínas de secreción se encuentran con máquinas moleculares que ayudan al correcto plegamiento de las proteínas y evalúan sus conformaciones finales de tal manera que sólo aquellas proteínas plegadas y ensambladas correctamente continuarán su camino a lo largo de la ruta secretora (Chevet *et al.*, 2001; Kleizen y Braakman, 2004; Vembar y Brodsky, 2008). Se han identificado dos clases importantes de chaperonas que participan en este proceso: BiP (también conocida como GPR78) y calnexina/calreticulina. Ambas clases de proteínas forman complejos con varias co-chaperonas y proteínas redox para prevenir la agregación de las proteínas y favorecer así su plegamiento eficiente (Kleizen y Braakman, 2004). Existen evidencias experimentales que sugieren que, al igual que ocurre con otras proteínas que transitan a través de la ruta secretora, BiP se requiere para el correcto plegamiento y procesamiento de ciertas prohormonas, como por ejemplo la insulina (Zhang *et al.*, 2009). Las chaperonas moleculares y los factores asociados también reconocen e interaccionan con subunidades no nativas y desensambladas de proteínas multiméricas para su retro-translocación hacia el citoplasma, donde son degradadas mediante la maquinaria del sistema ubiquitina-proteasoma (Vembar y Brodsky, 2008). Esta ruta de degradación de proteínas asociada al RE (*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*; ERAD) actúa en coordinación con la ruta de señalización en respuesta a proteínas no plegadas (*Unfolding protein response*; UPR), que regula a su vez la expresión de genes que participan en la respuesta a la acumulación de proteínas no plegadas o mal plegadas en el RE (Travers *et al.*, 2000). Ambas rutas son componentes críticos de la maquinaria que controla la calidad de proteínas en el RE y disfunciones de éstas se han asociado con el desarrollo de diversas enfermedades endocrinas, entre las cuales cabe destacar la diabetes y el hipotiroidismo (Baryshev *et al.*, 2004; Scheuner y

Kaufman, 2008). Además de los complejos genéricos que ayudan al plegamiento de las proteínas en el RE, las células neuroendocrinas están dotadas de chaperonas no clásicas tales como la proteína 7B2, una proteína de secreción altamente conservada a lo largo de la evolución y que está relacionada con la subclase de chaperonas moleculares denominada chaperoninas (Braks y Martens, 1994).

Tras su plegamiento, las proteínas destinadas a la ruta secretora se separan selectivamente de las proteínas residentes en el RE. Este proceso ocurre en regiones específicas de salida del RE (*Endoplasmic reticulum exit sites*; EREs), que corresponden a subdominios de membrana altamente organizados (1-2 μm en diámetro) que se encuentran dispersos en la superficie del RE y en regiones adyacentes al ERGIC (revisado en Lippincott-Schwartz *et al.*, 2000). El *cargo* destinado a secreción se clasifica y concentra en EREs gracias a la actividad de los complejos citosólicos de cubierta COPII y de la GTPasa de bajo peso molecular Sar1, que regula el ensamblado de la cubierta de COPII, dando lugar finalmente a vesículas recubiertas de COPII que evaginan del RE cargadas con un producto específico (Figura 1) (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2000; Schekman y Orci, 1996). El proceso de ensamblado de COPII sobre la membrana del RE se ha caracterizado extensamente en levaduras y células de mamíferos (revisado en Spang, 2009). Cabe destacar que algunos componentes de la cubierta de COPII (*i.e.* la familia de proteínas Sec24) contienen multitud de dominios independientes de reconocimiento del *cargo*, por lo que se ha propuesto que pueden interactuar con grupos específicos de proteínas *cargo* (Dancourt y Barlowe, 2010; Spang, 2009; Watanabe y Riezman, 2004). Asimismo, otras proteínas que se unen al complejo COPII, como las proteínas transmembrana de la familia p24 (subfamilias a, b, c y d), juegan un papel importante en la selección de proteína *cargo* soluble en el RE (Strating *et al.*, 2009). No obstante, aún se desconoce cómo estas y otras proteínas receptoras de *cargo* contribuyen al reclutamiento selectivo de proteínas específicas de secreción en los EREs en células neuroendocrinas.

Tras la evaginación a partir de la membrana del RE, las vesículas de transporte COPII pierden su cubierta y se fusionan con compartimentos intermediarios del pre-Golgi donde liberan el *cargo*, mientras que los receptores que han participado en la clasificación de las proteínas son reciclados al RE para que puedan participar en futuras rondas de exportación de *cargo* (Figura 1) (Dancourt y Barlowe, 2010). Los compartimentos intermediarios del pre-Golgi se movilizan a lo largo de microtúbulos

hacia el complejo de Golgi y descargan su contenido en la cara *cis* de este orgánulo (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2000). Además de la red de citoesqueleto, el tráfico entre el RE y el complejo de Golgi requiere la participación de una variedad de proteínas que se asocian a la cara citosólica de las vesículas de transporte, como diversos miembros de la familia de GTPasas Rab de bajo peso molecular y factores de *tethering*, que dirigen a las vesículas de transporte específicamente hacia las membranas del complejo de Golgi, así como complejos SNARE que median los eventos que tienen lugar durante la fusión de membranas y la subsiguiente transferencia del cargo al complejo de Golgi (Appenzeller-Herzog y Hauri, 2006; Cai *et al.*, 2007; Jackson, 2009).

1.1.3.- El complejo de Golgi

El complejo de Golgi está compuesto por cisternas aplanadas que se alinean en paralelo para formar un apilamiento. En vertebrados, el complejo de Golgi contiene varios de estos apilamientos, los cuales se encuentran polarizados en un modo *cis/trans*. Las cisternas con la misma polaridad que se encuentran en apilamientos adyacentes están conectadas entre sí mediante túbulos delgados formando una red compacta yuxtannuclear denominada el *Golgi ribbon* (Jackson, 2009; Lowe, 2011). El complejo de Golgi lleva a cabo dos funciones principales: la modificación de proteínas y lípidos a medida que estos pasan a través del mismo y la clasificación y envío de las proteínas y lípidos resultantes hacia sus destinos finales (Munro, 1998). Las modificaciones post-traduccionales de proteínas en el complejo de Golgi, que incluyen O-glucosilación y modificación de cadenas de oligosacáridos, sulfatación, fosforilación y procesamiento proteolítico, son llevadas a cabo por enzimas residentes en el complejo de Golgi que se encuentran distribuidas normalmente en grupos de cisternas específicos (Munro, 1998). Esto permite que las proteínas en tránsito se encuentren con las enzimas de una manera secuencial, lo que es fundamental para el procesamiento eficiente de las proteínas de secreción. Por ejemplo, las cadenas de oligosacáridos de hormonas glucoproteicas, como la hormona estimulante del tiroides (TSH) o la hormona foliculo-estimulante (FSH), son modificadas por glucosidasas de las caras *cis*, medial y *trans* del Golgi, mientras que la sulfatación y la sialilación de los oligosacáridos resultantes ocurren en las zonas más distales (Melmed, 2002; Rozell y Okrainetz, 2009). Por otra parte, el procesamiento proteolítico de muchas prohormonas comienza en el TGN (*e.g.* prosomatostatina) (Xu y Shields, 1993).

Asimismo, el TGN contiene las proteínas de clasificación que seleccionan y concentran grupos particulares de proteínas de secreción en las vesículas de transporte correspondientes (Munro, 1998).

Una cuestión importante aún sin establecer totalmente es cómo las proteínas de secreción son capaces de atravesar el complejo de Golgi, desde su cara *cis* hasta el TGN, mientras que las proteínas residentes son retenidas en compartimentos específicos del orgánulo. La mayor parte de las evidencias experimentales disponibles apoyan la idea de que el transporte del cargo a través del Golgi ocurre vía *maduración cisternal* (revisado en Glick y Nakano, 2009; Nakano y Luini, 2010). Este modelo propone que las cisternas se ensamblan en la cara *cis* del apilamiento, progresan a lo largo del apilamiento arrastrando consigo a las proteínas secretoras *cargo* y finalmente se desintegran en el TGN como consecuencia de la formación de vesículas de transporte. Al mismo tiempo, vesículas de transporte retrógrado (*i.e.* vesículas COPI) (Figura 1) que se forman a partir de los bordes de cisternas distales se fusionan con las cisternas adyacentes previas para reciclar las proteínas residentes del Golgi. Un modelo alternativo a éste propone que las proteínas residentes del Golgi son retenidas en las cisternas mientras que el cargo destinado a secreción es transportado activamente desde una cisterna a la siguiente en un transporte anterógrado mediado por vesículas COPI (*modelo de transporte vesicular*) (Glick y Nakano, 2009; Lowe, 2011; Nakano y Luini, 2010). Se ha propuesto que estos dos mecanismos de transporte pueden co-existir o predominar uno con respecto al otro de acuerdo al tipo de *cargo* y al tipo celular. La mayoría de los estudios sobre el tráfico de proteínas a través del complejo de Golgi se han llevado a cabo en levaduras o en células de mamífero con una actividad secretora reducida, por lo que todavía no existen evidencias experimentales de cómo funciona este proceso en células con una alta tasa de producción y secreción proteica. Se ha propuesto no obstante un mecanismo adicional de transporte de proteínas a través del complejo de Golgi compatible con el modelo de maduración cisternal que puede operar en células que producen grandes cantidades de proteína, como es el caso de las células endocrinas en condiciones de estimulación. Mediante microscopía electrónica de alta resolución y reconstrucciones tomográficas del complejo de Golgi, se ha mostrado que la estimulación de la secreción de insulina mediante el tratamiento de células β de ratón con glucosa desencadena la aparición de estructuras tubulares que conectan diferentes cisternas

dentro de un apilamiento de Golgi (Marsh *et al.*, 2004). Sobre la base de estas observaciones, se ha propuesto que las conexiones tubulares proporcionarían un lumen continuo que facilitaría el tránsito rápido de grandes cantidades de proteína de nueva síntesis para su secreción. Aún se desconoce si dichas conexiones entre cisternas también aparecen en otros tipos celulares endocrinos.

Por otra parte, el complejo de Golgi se encuentra decorado por una serie de proteínas *long coiled-coil*, transmembrana o asociadas de manera periférica a la membrana, las denominadas golginas, que junto con ciertas proteínas Rab actúan como factores de *tethering* permitiendo el correcto direccionamiento de las vesículas de tránsito a través del complejo de Golgi (Barr y Short, 2003). Recientemente se ha identificado la primera proteína *long coiled-coil* asociada al Golgi, denominada *Neuroendocrine long coiled-coil protein 1* (NECC1) (Cruz-García *et al.*, 2007), que interviene en el tráfico de *cargo* de secreción regulada a través de dicho orgánulo en células neuroendocrinas (Cruz-García *et al.*, 2012).

1.1.3.1.- Modificaciones post-traduccionales de proteínas en el complejo de Golgi

1.1.3.1.1.- Glucosilación

Normalmente se añaden dos tipos básicos de carbohidratos a glicoproteínas en el complejo de Golgi: el primero supone la unión de una N-acetilglucosamina (GlcNAc) a un residuo de Asn (N-glucosilación) de un polipéptido, proceso que tiene lugar en el RE, y el segundo supone la adición de una N-acetilgalactosamina (GalNAc) a un residuo de Ser o de Thr (O-glucosilación), modificación que ocurre en el complejo de Golgi, donde también tiene lugar el procesamiento y la modificación de cadenas de oligosacáridos del tipo N u O mediante la adición de grupos sulfato o siálico que pueden dar lugar a diferentes isoformas de proteínas (Rozell y Okrainetz, 2009). Existen multitud de ejemplos de proteínas de secreción glucosiladas en el reino animal, desde crustáceos (*i.e.* hormonas androgénicas) (Greve *et al.*, 2004) e insectos (*i.e.* hormona protoracicotrópica) (Adams, 2006), hasta peces (*i.e.* péptido *ghrelin-like*) (Kaiya *et al.*, 2009), anfibios (*i.e.* POMC) (Lamacz *et al.*, 1991) o mamíferos (*i.e.* POMC, proencefalina, etc). La glucosilación de proteínas es por tanto una modificación post-traducciona crucial para el mantenimiento de la actividad biológica de proteínas de secreción. De acuerdo con esto, se ha demostrado que la O-glucosilación de ciertas hormonas secretadas por el lóbulo anterior de la hipófisis,

TSH, FSH y LH, es necesaria para mantener la vida media y la bioactividad de estas hormonas, aunque no parece modificar su capacidad de unión a los receptores o la señalización intracelular activada tras la unión al receptor correspondiente (Fares, 2006).

1.1.3.1.2.- O-Fosforilación

Se ha demostrado que algunas pro-hormonas, como la POMC (Browne *et al.*, 1981), la proencefalina (Watkinson *et al.*, 1989) y la progastrina (Varro *et al.*, 1988), sufren O-fosforilación en residuos de Ser, proceso que tiene lugar en las regiones *trans* del complejo de Golgi (Rosa *et al.*, 1992). Se ha propuesto que la O-fosforilación determina el grado de procesamiento de la progastrina (Bishop *et al.*, 1998), mientras que el significado funcional de esta modificación post-traducciona en otras proteínas aún se desconoce.

1.1.3.1.3.- Sulfatación

Muchas hormonas y neuropéptidos se sulfatan en residuos de Tyr, un proceso que ocurre en el TGN (Fernandez *et al.*, 1997; Huttner, 1988). El papel biológico de esta modificación post-traducciona aún se conoce poco y, aunque se ha demostrado que es esencial para que la colecistoquinina (CCK) mantenga su actividad óptima (Beinfeld, 2003) y que se requiere para que tenga lugar el procesamiento correcto de la progastrina (Bundgaard *et al.*, 1995), estudios realizados en células corticotropas hipofisarias sugieren que la sulfatación de proteínas no es necesaria para el transporte intracelular, clasificación o procesamiento proteolítico de otras proteínas de secreción, como la POMC y sus péptidos derivados, la PC2 o la secretogranina III (van Kuppeveld *et al.*, 1997).

1.1.3.1.4.- Procesamiento proteolítico de precursores de proteínas

Muchas proteínas de secreción se sintetizan como precursores polipeptídicos inactivos que requieren una endoproteólisis controlada para convertirse en péptidos biológicamente activos. Este proceso tiene lugar sobre residuos dibásicos (normalmente en Lys-Arg, Lys-Lys, Arg-Arg y Arg-Lys) que flanquean los extremos amino- y carboxilo-terminal de los precursores de hormonas y neuropéptidos. A veces, el procesamiento ocurre en residuos monobásicos de Arg, como es el caso de la provasopresina, prosomatostatina y otros neuropéptidos, o incluso puede tener lugar

en residuos tribásicos, como en la ACTH para dar lugar a α -MSH (revisado en Hook *et al.*, 2008). En células neuroendocrinas, la proteólisis está mediada por dos tipos de proteasas: *i*) las convertasas de pro-hormonas relacionadas con la subtilisina y, en particular, las convertasas específicas de células neuroendocrinas PC1/3 y PC2, que procesan una gran variedad de pro-proteínas, como POMC, proinsulina, proGHRH o proPACAP (Seidah, 2011), y *ii*) la proteasa catepsina L de vesículas de secreción, que procesa la proencefalina y otros neuropéptidos (Yasothornsrikul *et al.*, 2003).

Tras la proteólisis por convertasas, los aminoácidos básicos del extremo carboxilo-terminal de los intermediarios son eliminados por metalocarboxipeptidasas especializadas (*i.e.* CPE y CPD), mientras que el procesamiento mediado por la catepsina L se continúa con una etapa adicional que consiste en la eliminación de residuos de aminoácidos básicos del extremo amino-terminal gracias a la acción de una aminopeptidasa Arg/Lys (revisado por Hook *et al.*, 2008).

Aunque el procesamiento proteolítico mediado por PC1/3 y PC2 tiene lugar principalmente en gránulos de secreción (Seidah, 2011; Seidah y Prat, 2002), el procesamiento y la maduración de estas enzimas en el TGN es esencial para su clasificación posterior hacia los gránulos de secreción inmaduros apropiados y para su posterior activación subsiguiente (Lou *et al.*, 2007; Muller y Lindberg, 1999). El procesamiento de POMC es un ejemplo bien conocido de la acción específica de tipo celular y coordinada de PC1/3 y PC2. En las células melanotropas del lóbulo intermedio de la hipófisis o en neuronas hipotalámicas productoras de POMC, el precursor es procesado en primer lugar por PC1/3 para generar, entre otros péptidos, ACTH (revisado en Pritchard y White, 2007). A continuación, la ACTH es procesada por PC2 para dar lugar a α -MSH y a *corticotrope-like intermediate peptide* (CLIP). Por su parte, las células adrenocorticotropas del lóbulo anterior de la hipófisis no expresan PC2 y, por lo tanto, sólo pueden producir ACTH (Wang y Majzoub, 2010). Así pues, la función de las convertasas de pro-hormonas está estrechamente unida a la naturaleza y cantidad de hormona producida y secretada por las células en respuesta a estímulos. En este sentido, se ha demostrado que la expresión de PC1/3, PC2 y de la prohormona que procesan estas convertasas, POMC, en células melanotropas está regulada de manera coordinada con la capacidad secretora de las células (Braks *et al.*, 1992; Peinado *et al.*, 2006).

1.1.4.- Clasificación de proteínas de secreción

Después de su viaje a través del complejo de Golgi, las proteínas de secreción esperan en el TGN a ser clasificadas y empaquetadas en vesículas de transporte específicas que toman diferentes rutas de tráfico intracelular para alcanzar la membrana plasmática. La primera evidencia experimental que demostró la existencia de diferentes rutas de tráfico post-Golgi fue proporcionada por los estudios de Gumbiner y Kelly (Gumbiner y Kelly, 1982), quienes analizaron y compararon las cinéticas de secreción de dos proteínas en la línea celular AtT20 de hipófisis de ratón: la hormona ACTH, que se secreta de una manera regulada, y la glicoproteína del virus de la leucemia murina gp70. Estos experimentos pioneros demostraron que, después de abandonar el Golgi, la glicoproteína vírica es transportada hacia la membrana plasmática en gránulos carentes de ACTH a más velocidad que aquellos gránulos que contienen la hormona, siendo además liberada en ausencia de estímulos extracelulares (Gumbiner y Kelly, 1982). Estas observaciones ayudaron a consolidar la teoría aceptada hoy en día que define rutas de tráfico post-Golgi distintas para proteínas destinadas a ser secretadas de una manera regulada o constitutiva (Kelly, 1985). La coexistencia de ambas rutas de secreción en el mismo tipo celular implica la presencia de mecanismos que permitan la clasificación de proteínas en las vesículas de transporte correctas. Para explicar los procesos de clasificación que ocurren en el complejo de Golgi y en compartimentos post-Golgi, se han propuesto dos modelos. El primero y más popular, la hipótesis *sorting-for-entry*, propone al TGN como compartimento donde tiene lugar la clasificación de proteínas de secreción (Arvan y Castle, 1998; Kelly, 1985; Kuliawat y Arvan, 1994; Tooze, 1998). Según este modelo, que se representa de manera esquematizada en la Figura 3, las proteínas serían clasificadas mediante su interacción con receptores de clasificación que reconocerían un amplio espectro de proteínas de secreción, las cuales serían empaquetadas en gránulos de secreción de nueva formación o inmaduros (*i.e.* ISGs). Para que este proceso sea eficiente, se requiere que un solo receptor de clasificación sea capaz de empaquetar en los gránulos de secreción nacientes un número importante de proteínas de secreción al mismo tiempo. En apoyo de esta idea, se ha mostrado que las proteínas de secreción tienden a formar agregados insolubles en el TGN (Chanat y Huttner, 1991) que son empaquetados en masa en ISGs (Bauerfeind y Huttner, 1993). Además, la formación de estos agregados permite la exclusión eficiente de proteínas de secreción no regulada, que, por su parte, saldrían del TGN siguiendo un itinerario

por defecto, la ruta de secreción constitutiva. La familia de las graninas representa un ejemplo bien conocido de proteínas de secreción que son dirigidas a la ruta de secreción regulada en forma de agregados. A pH bajo y a la concentración de Ca^{2+} elevada existente en el TGN, las graninas cromogranina A y B (CgA y CgB) y la secretogranina II (SgII) se agregan de manera eficiente y excluyen a proteínas de secreción constitutiva (Glombik y Gerdes, 2000). Además, se ha propuesto que la CgA y CgB (Beuret *et al.*, 2004; Courel *et al.*, 2006; Huh *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2001) y, más recientemente, SgII (Courel *et al.*, 2010) y SgIII (Hosaka y Watanabe, 2010) cumplen importantes funciones en la biogénesis de gránulos de secreción. Así, estudios en células de feocromocitoma de rata PC12, han mostrado que el silenciamiento de las graninas provoca una disminución significativa del número de gránulos de secreción densos a los electrones (*i.e.* que contienen proteínas de secreción) e impide el tráfico de proteínas a estos gránulos. Además, la sobreexpresión de estas proteínas en líneas celulares que carecen de una ruta de secreción regulada fue suficiente para el establecimiento de dicha ruta (Courel *et al.*, 2006; Montero-Hadjadje *et al.*, 2009; Pance *et al.*, 2006). En concreto, se ha demostrado que las regiones amino- y carboxilo-terminales de la CgA, que está muy conservada a escala evolutiva, son necesarios para la formación de estructuras móviles similares a gránulos en una línea celular que sólo presenta secreción constitutiva, las células COS-7 (Montero-Hadjadje *et al.*, 2009). Más aún, estudios recientes han mostrado que la CgA induce el reclutamiento de proteínas de unión al citoesqueleto, así como GTPasas y proteínas de unión a Ca^{2+} que, en conjunto, facilitan el desplazamiento de los gránulos de secreción a través de la red intracelular de microtúbulos y la red cortical de actina para la liberación controlada de su contenido (Elias *et al.*, 2012).

El otro modelo que explicaría la clasificación de proteínas en la ruta de secreción regulada, el modelo de *sorting-by-retention*, fue propuesto a partir de los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo en células b pancreáticas. En estas células, la insulina forma agregados tras su empaquetamiento en ISGs (Arvan *et al.*, 1991), lo que condujo a proponer que, en lugar de una clasificación activa de proteínas en el TGN, la mayor parte del proceso de clasificación tendría lugar en ISGs post-Golgi (Arvan y Castle, 1998). Así pues, según este modelo, el TGN actuaría como un compartimento de clasificación no selectivo que daría lugar a ISGs con proteínas de secreción regulada y constitutiva. Este último grupo de proteínas sería excluido de los

ISGs gracias a su unión a receptores de clasificación y/o a sus ineficientes propiedades de retención, o a su incapacidad de formar agregados. Puesto que la ruta de salida de ISG se basa en la formación de vesículas que comparten características moleculares con las de la ruta de secreción regulada (*i.e.* cubiertas proteicas de AP-1/clatrina; Figura 1), esta ruta alternativa se ha denominado *constitutive-like secretion* para diferenciarla de la ruta constitutiva clásica (Arvan y Castle, 1992). En la Figura 3, se representan de manera esquemática cómo ocurriría la clasificación de proteínas de secreción según los dos modelos propuestos.

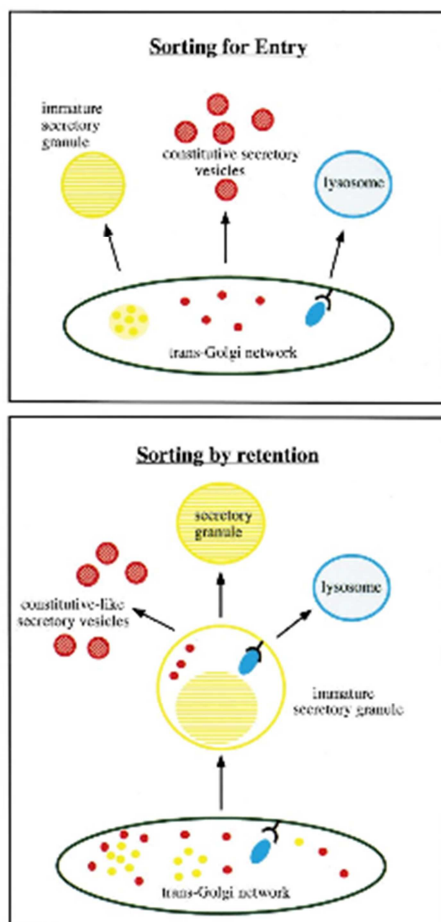


Figura 3: Representación esquemática de los mecanismos de clasificación en la ruta de secreción regulada de células (neuro)endocrinas. En el esquema se representan los dos modelos propuestos para explicar la formación de gránulos de secreción regulada a partir del TGN (*i.e.* *sorting-for-entry*) o de estructuras post-Golgi (*i.e.* *sorting-by-retention*). Asimismo, se incluyen otras estructuras vesiculares, como las vesículas de secreción *constitutive-like* y las rutas que seguirían las enzimas lisosomales según cada modelo. En amarillo se representan las proteínas de secreción regulada que van a ser empaquetadas en gránulos de secreción, en rojo los productos destinados a la ruta de secreción constitutiva y en azul las proteínas enzimáticas que formarán parte del contenido de lisosomas. Tomado de Tooze, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998.

1.1.5. Gránulos de secreción inmaduros

Se considera que los ISGs representan intermediarios vesiculares de vida corta que, mediante un proceso que no es del todo conocido, dan lugar a gránulos de secreción maduros (MSG), aptos para liberar su contenido mediante exocitosis (Robinson y Martin, 1998; Tooze *et al.*, 1991). Los ISGs representan un bajo porcentaje de las vesículas presentes en células secretoras, lo que dificulta su estudio.

Estudios de pulso-caza realizados en células PC12 han mostrado que los ISGs se transforman en gránulos maduros en un tiempo medio de 45 min, durante el cual tiene lugar un aumento de tamaño de los mismos, lo que ha llevado a sugerir que los MSG se forman mediante la fusión de ISGs (de 3-5 ISGs por MSG) (Tooze *et al.*, 1991; Urbe *et al.*, 1998), en un proceso mediado por la proteína SNARE sintaxina 6 (Wendler *et al.*, 2001). Además, los ISGs contienen proteínas de la ruta constitutiva, así como enzimas lisosomales y otras proteínas mal clasificadas en el TGN, que son eliminadas de los mismos durante el proceso de maduración. Se ha propuesto que el exceso de membrana y las proteínas que no son propias de los MSGs son eliminados de los ISGs a través de vesículas recubiertas de clatrina que emergerían de dichos gránulos (revisado en Arvan *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 2006; Tooze *et al.*, 2001). Entre las proteínas de la membrana de los ISGs que son eliminadas durante el proceso de maduración de los SGs se encuentran la furina (Dittie *et al.*, 1996; Dittie *et al.*, 1997), la carboxipeptidasa D (Varlamov *et al.*, 1999), el receptor de manosa-6-fosfato (Klumperman *et al.*, 1998; Kuliawat *et al.*, 1997) y las proteínas SNARE sintaxina 6 (Klumperman *et al.*, 1998; Wendler *et al.*, 2001) y VAMP4 (Eaton *et al.*, 2000; Hinners *et al.*, 2003). Se ha propuesto que este proceso está mediado por el reclutamiento, por parte de furina, MRP y VAMP4, de la proteína adaptadora de clatrina AP-1, que mediaría la interacción entre el cargo y la cubierta de clatrina (Dittie *et al.*, 1999; Dittie *et al.*, 1997; Hinners *et al.*, 2003). Además de AP-1, existen otras proteínas adaptadoras de clatrina, como las GGAs (*Golgi-associated, γ ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding proteins*), que facilitan la clasificación del cargo a retirar de los ISGs en vesículas recubiertas de clatrina (Kakhlon *et al.*, 2006). Las proteínas citadas, que residen en ISGs pero no en MSGs, se han utilizado como marcadores de los mismos. Otras proteínas adicionales localizadas en ISGs son ARF1 (*ADP-ribosylation factor 1*), que es responsable del reclutamiento de AP-1 a los ISGs (Austin *et al.*, 2000; Dittie *et al.*, 1996), y un miembro de la familia de proteínas transmembrana reguladoras del tráfico de membranas sinaptotagminas, la sinaptotagmina IV (Fukuda *et al.*, 2003). Curiosamente, la sinaptotagmina IV se localiza en ISGs y también en el complejo de Golgi en células PC12 bajo condiciones basales, en las que no colocaliza con los marcadores habituales de gránulos de secreción (sinaptotagminas I y IX, Rab3A, Rab27A, VAMP2, o sinaptofisina) (Fukuda *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando las

células son estimuladas con la neurotrofina NGF, la sinaptotagmina IV se redistribuye hacia MSGs que pueden sufrir exocitosis regulada por Ca^{2+} (Fukuda *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado anteriormente, la maduración de los ISGs conlleva la eliminación de los mismos de proteínas solubles y prohormonas no procesadas, así como de proteínas lisosomales o endopeptidasas de endosomas erróneamente clasificadas hacia la ruta de secreción regulada (Arvan *et al.*, 1991; Tooze *et al.*, 2001). Así, se ha propuesto que las vesículas recubiertas de clatrina derivadas de los ISGs son conducidas a endosomas, a partir de los cuales las proteínas cargo serían transportadas a la superficie celular mediante el proceso definido como “*constitutive-like secretion*” (Arvan y Castle, 1998; Kim *et al.*, 2006). Algunos autores también sugieren que las proteínas de las ISGs pueden ser conducidas, directamente o desde los endosomas, hacia el TGN (Kim *et al.*, 2006; Tooze *et al.*, 2001); este es el caso de la furina, que es una proteína residente en el TGN (Dittie *et al.*, 1997). Por su parte, las proteínas lisosomales asociadas a los MPRs existentes en las ISGs serían dirigidas desde los endosomas hacia lisosomas (Arvan y Castle, 1998; Kim *et al.*, 2006; Tooze *et al.*, 2001). Finalmente, el proceso de maduración de los GS, desde ISGs hasta MSGs, conlleva la acidificación progresiva de su contenido ($\text{pH}_{\text{TGN}} \sim 6.5-6.2$; $\text{pH}_{\text{ISG}} \sim 6.3-5.7$; $\text{pH}_{\text{MSG}} \sim 5.5-5.0$), lo que permite la activación de las convertasas y el procesamiento subsiguiente de las prohormonas y proneuropéptidos así como la condensación del cargo (revisado por Kim *et al.*, 2006).

Mediante estudios de imagen *in vivo* en células PC12 transfectadas con una forma mutante de la proteína verde fluorescente [GFP(S65T)] que permite seguir el movimiento de los gránulos recién formados a partir del TGN, se ha mostrado que los ISGs se transportan en cuestión de segundos, de forma directa y a través de la red de microtúbulos, hacia la red de actina situada en la periferia celular, donde completan su proceso de maduración en cuestión de horas (Rudolf *et al.*, 2001). Curiosamente, en esta última fase de maduración, un número importante de gránulos de secreción se mantiene inmóvil, estando la mayoría de dichos gránulos fijados a la red cortical de actina (Rudolf *et al.*, 2001).

1.1.6.- Clasificación y destino de las proteínas

Independientemente del compartimento intracelular donde tiene lugar la clasificación hacia la ruta de secreción regulada (*i.e.* TGN o ISGs post-Golgi), las proteínas destinadas a ser secretadas de manera regulada deben contener regiones

concretas en sus secuencias que puedan ser reconocidas por los receptores de clasificación para segregarlas de las proteínas de secreción constitutiva. Se ha demostrado que algunas proteínas de secreción regulada poseen dichas secuencias. Por ejemplo, los 26 aminoácidos del extremo NH₂-terminal de la POMC contiene información esencial para dirigir al precursor hacia la ruta de secreción regulada, ya que la expresión de formas mutadas de POMC que carecen de esta región (*i.e.* Δ_2 - Δ_{26} -POMC) en células AtT20 provoca la acumulación de la hormona ACTH en el complejo de Golgi, pero no en gránulos de secreción (Cool y Loh, 1994). Otros estudios han demostrado la presencia de dominios de clasificación similares en la CgB (*i.e.* un puente disulfuro altamente conservado en la región NH₂-terminal de la proteína) (Glombik y Gerdes, 2000; Glombik *et al.*, 1999; Kromer *et al.*, 1998) y en la CgA (*i.e.* el bucle formado entre las Cys17 y Cys38 junto con la región 77-115 de la proteína) (Taupenot *et al.*, 2002). Además, recientemente se ha mostrado que los 77 últimos aminoácidos del extremo NH₂-terminal de la CgA son suficientes para reinstaurar la ruta de secreción regulada en una variante de células PC12 deficientes en la formación de gránulos de secreción, las células A35C (Stettler *et al.*, 2009).

Otra línea de investigación se ha dedicado a identificar los receptores de clasificación responsables de dirigir las proteínas de secreción a los ISGs. Actualmente está ampliamente aceptado que los gránulos de secreción no son todos iguales, incluso en un mismo tipo celular, y que, por tanto, deben existir mecanismos de selección para dirigir las proteínas de secreción hacia gránulos morfológicamente distintos. Las primeras evidencias experimentales de la existencia de receptores de clasificación se obtuvieron en 1997, cuando se identificó la proteína asociada a membrana carboxipeptidasa E (CPE) como posible receptor de POMC y de otras prohormonas en células hipofisarias (Cool *et al.*, 1997). En este mismo trabajo se observó que la carencia de CPE conllevaba la clasificación errónea de POMC hacia la ruta de secreción constitutiva (Cool *et al.*, 1997). Sin embargo, en un estudio coetáneo se puso en duda este modelo, ya que se descubrió que la clasificación de la proinsulina hacia la ruta de secreción regulada no se encontraba afectada en ratones *knockout* deficientes en CPE (Irminger *et al.*, 1997). De nuevo, estos resultados opuestos apuntan a la co-existencia de diferentes mecanismos de clasificación que determinan la naturaleza del contenido de los gránulos de secreción. Desde el hallazgo de CPE, se han descrito otras proteínas asociadas a membrana que actúan de

una manera similar a dicha proteína, ayudando a la agregación y condensación de proteínas en los gránulos de secreción. Entre otras, se encuentran la convertasas PC1/3 (Arnaoutova *et al.*, 2003; Jutras *et al.*, 2000) y PC2 (Assadi *et al.*, 2004). Mediante el uso de resonancia magnética nuclear se ha podido resolver la estructura del dominio responsable de la clasificación de proteínas a gránulos de secreción en PC1/3. Consiste en dos hélices anfipáticas localizadas en el extremo COOH-terminal de la proteína (residuos 711-753) que están conservadas desde peces a humanos (Dikeakos *et al.*, 2009).

1.1.7.- Tráfico post-Golgi de gránulos de secreción

Los gránulos de secreción se forman a partir de subdominios específicos del TGN que presentan características típicas de balsas lipídicas: zonas ricas en colesterol, glucoesfingolípidos y esfingomiélin (Dhanvantari y Loh, 2000). En concreto, se ha demostrado que el colesterol es crítico para la biogénesis de gránulos (Wang *et al.*, 2000). Además, estos microdominios del TGN de tipo balsas lipídicas facilitan el reclutamiento de abundantes proteínas con funciones granulogénicas. Entre éstas se encuentran los receptores de clasificación mencionados anteriormente (Dikeakos y Reudelhuber, 2007), así como proteínas que reclutan las proteínas de cubierta y regulan su ensamblado (*i.e.* factores de *tethering*, quinasas, fosfatasa, chaperonas y proteínas adaptadoras) (Lafer, 2002) y proteínas que confieren especificidad tanto en el transporte como en el proceso de fusión con las regiones de la membrana plasmática especializadas en secreción (*i.e.* v-SNAREs y GTPasas Rab) (Bonifacino y Glick, 2004). Tras su formación, las vesículas de transporte pierden su cubierta debido a la inactivación de proteínas Rab particulares y a la activación de enzimas de *uncoating*. Es entonces cuando los complejos proteicos motores anclan las vesículas a elementos del citoesqueleto (*i.e.* microtúbulos) para transportarlas hacia zonas activas de exocitosis en la membrana plasmática (Figura 2). El transporte de largo recorrido de gránulos de secreción es dependiente de los motores moleculares de asociación a microtúbulos, las quinesinas que, en su mayoría, transfieren carga en dirección anterógrada hacia las zonas de secreción, y la dineína citoplasmática, que media el movimiento retrógrado. Por otra parte, los trayectos más cortos y precisos que los gránulos de secreción presentan cerca de la membrana plasmática son dependientes de los motores asociados al citoesqueleto de actina, las miosinas, que son responsables de la aproximación final de los gránulos a la membrana (Atkinson *et al.*, 1992;

Goldstein y Yang, 2000; Park y Loh, 2008; Sheetz, 1999; Vaughan y Dean, 2006). Así pues, tanto la red de microtúbulos como los filamentos de actina contribuyen de manera esencial en el transporte de gránulos de secreción.

Las quinesinas constituyen una gran superfamilia de proteínas con más de 45 miembros. El miembro de la familia mejor conocido es quinesina-1, que se organiza como un heterotetrámero que contiene dos cadenas pesadas (*i.e.* KHC) y dos cadenas ligeras (*i.e.* KLC). La región NH₂-terminal de KHC está altamente conservada entre todos los miembros de la familia y es donde se localiza el dominio motor, que incluye una región de interacción con microtúbulos y un dominio de unión a ATP. En cambio, las quinesinas divergen considerablemente en sus dominios de reconocimiento y unión al cargo (revisado en Hirokawa *et al.*, 2010). En el caso concreto de la quinesina-1, el dominio de unión al cargo reside en las KLCs (Bowman *et al.*, 2000; Verhey *et al.*, 2001). Por su parte, la superfamilia de dineínas comprende dos grandes grupos de proteínas: las dineínas ciliares y la dineína citoplasmática. Sólo esta última está implicada en el transporte intracelular, dirigiendo *cargos* de forma retrógrada hacia los extremos (-) de los microtúbulos (Pfister *et al.*, 2005). Por tanto, la proteína motora reclutada en un momento concreto determina la dirección de movimiento de las vesículas a lo largo de los microtúbulos. Este reclutamiento está controlado por el estado de fosforilación de diferentes proteínas que, junto con los motores, forman parte de los complejos motores moleculares que regulan la direccionalidad del transporte vesicular. Por ejemplo, cuando está fosforilada, la proteína huntingtina inicia el movimiento anterógrado de vesículas de secreción mediado por quinesinas. Por el contrario, cuando huntingtina no se encuentra fosforilada se favorece su unión a dineína, lo que conlleva el movimiento retrógrado del *cargo* (Colin *et al.*, 2008). En la mayoría de los casos, los motores moleculares no interaccionan directamente con las vesículas de transporte, sino que lo hacen a través de proteínas y lípidos intermediarios presentes en la superficie de dichas vesículas. En este contexto, se han identificado varios miembros de la familia de GTPasas Rab como potentes reguladores del reclutamiento de proteínas motoras.

1.1.8.- Amarre (*tethering*), anclaje (*docking*) y fusión de gránulos de secreción con la membrana plasmática

Las vesículas que contienen proteínas cuyo destino es la secreción celular deben ser dirigidas a la membrana plasmática de una manera específica y ser ancladas a ésta

para que se produzca la fusión y la descarga de su contenido. Este proceso es común al que sucede en cualquiera de las etapas de transporte entre dos compartimentos de membrana, con algunas particularidades. En una primera etapa del proceso, referida como *tethering*, las vesículas se reúnen en zonas de liberación gracias a la acción de proteínas *long coiled-coil* o *multisubunit complexes*, que forman uniones físicas estables entre las vesículas y la membrana diana. Algunas proteínas *long coiled-coil* se han localizado en estrecha proximidad a la membrana plasmática en neuronas (*i.e.* la familia de proteínas liprina- α) y se ha propuesto que pueden actuar como factores de andamiaje que regulan el tráfico vesicular y el ensamblado y maduración de la sinapsis (Spangler y Hoogenraad, 2007). Entre los *multisubunit complexes*, el exocisto es el mejor caracterizado hasta el momento (Heider y Munson, 2012). Se ha propuesto que el exocisto es responsable de la polarización de la secreción en levaduras, donde se localiza en zonas activas de exocitosis en la membrana plasmática (Guo *et al.*, 1999). De hecho, muchas de las subunidades que forman parte de este complejo se han identificado gracias a la generación de mutantes de levadura que acumulan vesículas destinadas a la membrana plasmática (Guo *et al.*, 1999). El exocisto de levaduras está compuesto por 8 subunidades que presentan estructuras de tipo bastón: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, y Exo84 (revisado en Hsu *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 1996; TerBush *et al.*, 1996). En levaduras, Sec3 es un efector aguas abajo de Rho1 y Cdc42, que podría conectar las vesículas de secreción ancladas a los filamentos de actina con el complejo del exocisto (Guo *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). Se piensa que las otras subunidades se ensamblan durante su transporte en vesículas de secreción derivadas del complejo de Golgi mediante su interacción con Sec4, una GTPasa Rab de levaduras presente en la superficie de estas vesículas (Guo *et al.*, 1999). El exocisto de mamíferos (*e.g.* el complejo Sec6/Sec8) (TerBush *et al.*, 1996) está compuesto también por 8 subunidades y es crítico para el crecimiento polarizado y la secreción (Heider y Munson, 2012). En concreto, el complejo del exocisto actúa como un regulador selectivo de la fase de *docking* de vesículas que contienen insulina, controlando su acercamiento y unión a zonas concretas de la membrana plasmática (Tsuboi *et al.*, 2005).

Después de la fase de *tethering*, las vesículas de secreción entran en la denominada fase de *docking*. Las vesículas que se encuentran en esta etapa se definen, en las micrografías electrónicas, como aquellas vesículas que no presentan una

distancia medible con respecto a la membrana plasmática (de Wit, 2010; Verhage y Sorensen, 2008). La etapa final del ciclo de vida de una vesícula de secreción es su fusión con la membrana plasmática. Estudios pioneros sobre la exocitosis de vesículas sinápticas demostraron que este proceso está dirigido por 3 grupos de proteínas, conocidas como SNAREs. Un grupo, VAMP o sinaptobrevina, fue encontrado en asociación con la superficie de la vesícula sináptica, mientras que los otros dos grupos, syntaxina y SNAP-25, fueron localizados en la hemicapa interna de la membrana presináptica (Sollner *et al.*, 1993). Posteriormente, se propuso que este proceso está relacionado mecánicamente con todos los eventos de fusión de membranas intracelulares, dando lugar a la hipótesis SNARE (Rothman, 1994). De hecho, hoy en día está ampliamente aceptado que una v-SNARE asociada a la superficie de la vesícula de transporte se une específicamente a una t-SNARE de la membrana diana, formando así el complejo *trans*-SNARE que genera la fuerza necesaria para promover la fusión de las dos membranas. Este proceso requiere la participación de un número importante de proteínas accesorias, que regulan la dinámica del complejo *trans*-SNARE en la zona activa de exocitosis. En células b pancreáticas, se ha demostrado que la glucosa provoca un aumento sustancial y sostenido de la liberación de insulina debido a un incremento del número de gránulos de secreción en fase de *docking*, resultando en la fusión de 5-40 gránulos/célula/min (Wang y Thurmond, 2009). La glucosa induce el remodelado del cortex de actina (*i.e.* F-actina) que, en condiciones basales, actúa como una barrera que impide la formación de los complejos SNARE. Se ha propuesto que, tras la estimulación con glucosa, la activación de las GTPasas de la familia Rho Cdc42 y Rac1, induce la reorganización de la F-actina, lo que permite la interacción de la proteína v-SNARE VAMP-2 con la t-SNARE syntaxina-4 y la subsecuente fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática (Wang y Thurmond, 2009).

1.2.- La familia de GTPasas Rab

1.2.1.- Consideraciones generales

Las proteínas Rab se incluyen dentro de la superfamilia de proteínas GTPasas de bajo peso molecular Ras. Como se ha mencionado en los apartados anteriores, las proteínas Rab participan en el control de multitud de etapas del tráfico intracelular de membranas que tienen lugar durante la ruta de secreción regulada. Además, estas

GTPasas también juegan papeles fundamentales en la señalización intracelular, la diferenciación y el desarrollo debido a su implicación directa en la regulación de la dinámica de las vesículas intracelulares, desde su formación hasta su fusión con la membrana diana correcta. Las proteínas Rab controlan la biogénesis de vesículas mediante la formación de los *multisubunit Rab tethers*, complejos reguladores que interactúan con las proteínas de cubierta (*i.e.* COPI, COPII y clatrina), influyendo en su reclutamiento hacia las zonas de evaginación en el compartimento donador y definiendo en última instancia la identidad de la vesícula de nueva formación (Angers y Merz, 2010). Las proteínas Rab también confieren especificidad en el direccionamiento correcto de las vesículas de transporte hacia el compartimento aceptor mediante su interacción, directa o indirecta, con motores moleculares, el reclutamiento de estos hacia la superficie de las vesículas e incluso la modulación de la procesividad del motor molecular a lo largo de la red del citoesqueleto (Echard *et al.*, 1998; Hammer y Wu, 2002; Jordens *et al.*, 2001; Kuroda y Fukuda, 2005). Finalmente, las GTPasas Rab también participan en los eventos de *tethering*, anclaje y fusión de membranas. Así, se asocian con proteínas v-SNARE y/o t-SNARE para formar los complejos *trans*-SNARE y organizar microdominios competentes para la fusión de membranas sobre la membrana aceptor (Wickner y Schekman, 2008). En la Figura 2 se ilustra la participación de las proteínas Rab en las diferentes etapas del ciclo de vida de una vesícula de transporte intracelular.

Además de las funciones relacionadas con la dinámica vesicular, las proteínas Rab también actúan como intermediarios en la integración de señales extracelulares en la maquinaria molecular responsable del tráfico intracelular de membranas (Miaczynska *et al.*, 2004). Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares regulados, puesto que ciclan entre un estado inactivo, en el que la proteína se encuentra unida a GDP y normalmente soluble en el citosol, y un estado activo, en el que la GTPasa está asociada a GTP, lo que permite su interacción con las membranas intracelulares (Pfeffer, 2005; Pfeffer y Aivazian, 2004; Seabra y Wasmeier, 2004). Así pues, el control de este ciclo de actividad, que depende de un amplio espectro de proteínas relacionadas con la transducción de señal, es clave para conferir coordinación espacial y temporal a la respuesta celular. En conjunto, el gran número de funciones que cumplen las GTPasas Rab ha hecho que se acepte ampliamente la idea de que estas proteínas son constituyentes centrales necesarios para orquestar la organización del sistema de endomembranas. Como consecuencia de la gran

importancia de estas proteínas en el correcto funcionamiento celular, la alteración de la síntesis y/o la actividad de estas GTPasas conllevan el desarrollo de graves (Zerial y McBride, 2001).

Varios análisis genómicos han mostrado que la familia Rab está compuesta por 11 miembros en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que en humanos existen más de 60 proteínas Rab diferentes (Colicelli, 2004; Zerial y McBride, 2001). El hecho de que haya 6 veces más proteínas Rab en humanos que en levaduras se atribuye a la necesidad de cubrir las demandas de especificidad en un sistema de tráfico de endomembranas cuyo grado de complejidad ha ido aumentando durante la evolución (Dacks y Field, 2004, 2007). De hecho, las diferentes GTPasas Rab se localizan en subcompartimentos distintos y, aunque en algunos casos varias proteínas Rab se asocian al mismo orgánulo, siempre están segregadas en microdominios espacio-temporales específicos (Sonnichsen *et al.*, 2000). La complejidad del sistema de proteínas Rab aumenta enormemente cuando se considera su modo de actuación. Estas proteínas siempre actúan en conjunción con un amplio rango de proteínas accesorias que bien regulan la actividad de las proteínas Rab o son reguladas por la activación de éstas. Estas proteínas accesorias, denominadas efectores de proteínas Rab, son en última instancia las responsables de traducir la función específica de la proteína Rab en la maquinaria molecular que dirige el posicionamiento intracelular de vesículas (Stenmark, 2009). En la Figura 4 se representa la localización intracelular de las proteínas Rab que han sido identificadas, tomando como modelo una célula epitelial e indicando la función atribuida a cada una de ellas.

1.2.2.- Características estructurales y funcionales de las proteínas Rab

Actualmente se dispone ya de la estructura cristalográfica de 16 GTPasas Rab en su conformación activa (*i.e.* unida a GTP) y 17 en su conformación inactiva (*i.e.* unida a GDP), lo que ha permitido proponer modelos generales sobre la organización estructural de estas proteínas (Eathiraj *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2009). Su estructura terciaria es muy similar a la estructura de otras GTPasas de la familia Ras y consiste en un barril central compuesto por 6 hojas β rodeadas de 5 hélices α . En $\alpha 1$ reside una región ampliamente conservada entre todas las GTPasas (Ostermeier y Brunger, 1999) y que incluye la plataforma de unión a GTP y un elemento de unión a Mg^{2+} , un cofactor necesario para que GTP se una con alta afinidad a la GTPasa y para su

posterior hidrólisis (Vetter y Wittinghofer, 2001). Otros análisis estructurales han definido también dos regiones, denominadas interruptores I y II, que se localizan entre los bucles $\alpha 1/\beta 2$ y $\beta 3/\beta 4$, respectivamente. Estas regiones son críticas para conferir especificidad funcional a las proteínas Rab, ya que contactan con el grupo γ -fosfato del GTP y, junto con la región que se encuentra entre los interruptores, sufre cambios conformacionales notables durante la activación de la GTPasa (Dumas *et al.*, 1999; Stroupe y Brunger, 2000). Dependiendo de la homología que presentan estas regiones

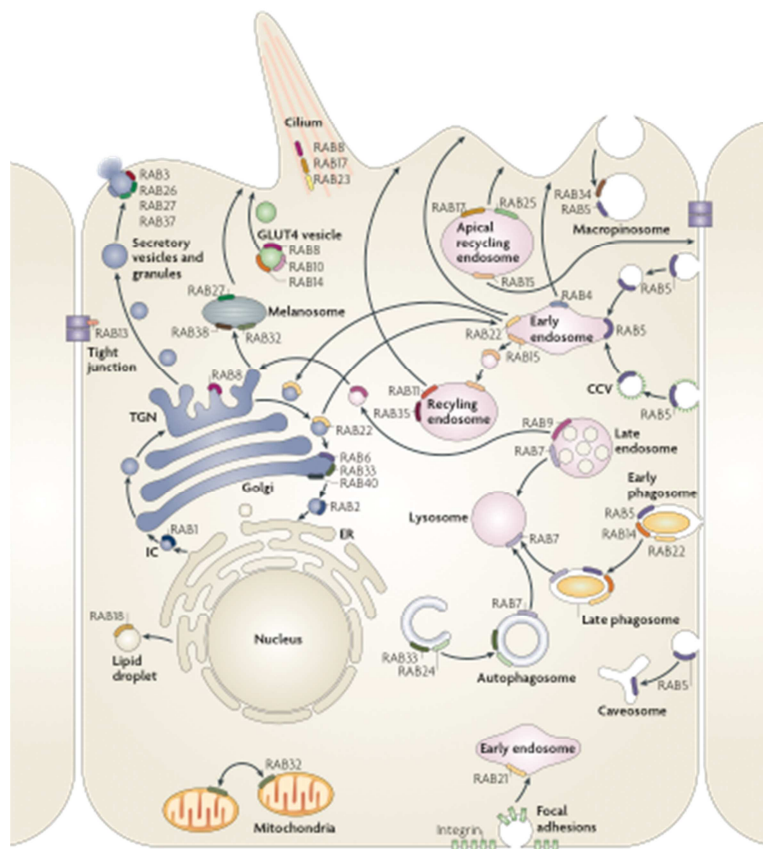


Figura 4: Localización y función de las proteínas GTPasas Rab. Célula epitelial con sus diferentes rutas de transporte intracelular de vesículas y las localizaciones de un número de proteínas Rab seleccionadas. Rab1 se localiza en las zonas de salida del RE y en el ERGIC y media el tráfico vesicular entre el Golgi y el RE. Rab2se encuentra en el ERGIC y, al igual que Rab1, podría participar en el control del tráfico entre el Golgi y el RE. Las proteínas Rab asociadas al complejo de Golgi, Rab6, Rab33 y Rab40, median el tráfico intra-Golgi. Rab33, junto con Rab24, también regula la formación de autofagosomas. Rab8 media el tráfico vesicular correspondiente a la ruta de secreción constitutiva entre el TGN y la membrana plasmática y también

participa en la translocación de GLUT4 a la superficie celular (junto con Rab10 y Rab14) y en la formación de cilios (junto con Rab17 y Rab23). Rab3, Rab26, Rab27 y Rab37 participan en el control de diferentes etapas de la ruta de secreción regulada y, en concreto, Rab27 media la translocación de melanosomas a la superficie celular. Rab32 y Rab38 están involucradas en la biogénesis de melanosomas y Rab32 también controla la fisión mitocondrial. Rab13 regula el ensamblado de las uniones estrechas entre células epiteliales. Rab18 controla las dinámicas de gotas lipídicas y gránulos de secreción. Rab22 media el tráfico vesicular entre el TGN y los endosomas tempranos y viceversa. Rab5, localizada en endosomas tempranos, fagosomas, caveosomas y la membrana plasmática, participa en la endocitosis, la macropinocitosis (junto con Rab34) y la maduración de endosomas tempranos (con Rab14 y Rab22). Rab21 media la endocitosis de integrinas. Rab11 y Rab35 regulan las fases lentas de la endocitosis de reciclaje, mientras que Rab4 controla las fases rápidas. Rab15 está involucrada en el tráfico entre endosomas tempranos y endosomas de reciclaje y en el tráfico de endosomas de reciclaje desde la membrana apical a las membranas basolaterales. Rab17 y Rab25 controlan el tráfico de endosomas de reciclaje hacia la membrana apical. Rab7 media la maduración de endosomas tardíos y fagosomas y su fusión con lisosomas: Rab9 regula el transporte de endosomas

tardíos hacia el TGN. Tomado de Stenmark Nature Rev. Mol. Cell Biol. 2009.

entre las diferentes proteínas Rab y la estructura terciaria que adoptan, los miembros de esta familia se han clasificado en 8 grupos filogenéticos compuestos por proteínas Rab relacionadas que presentan conformaciones activas similares (Pereira-Leal y Seabra, 2001). Por ejemplo, en Rab5 y Rab22, que pertenecen a la subfamilia V, los interruptores I y II adoptan conformaciones terciarias casi idénticas cuando las proteínas se activan (Eathiraj *et al.*, 2005).

La región que exhibe mayor divergencia evolutiva en términos de secuencia aminoacídica se encuentra en el dominio COOH-terminal que, en consecuencia, se ha denominado dominio hipervariable. Se ha sugerido que este dominio es responsable de la localización intracelular de las proteínas Rab (Chavrier *et al.*, 1991). Esta idea fue apoyada por primera vez gracias a estudios de fraccionamiento subcelular usando una proteína híbrida que contenía los 166 residuos aminoacídicos del extremo NH₂-terminal de Rab2, que localiza en el ERGIC, unidos bien a los 35 aminoácidos del extremo COOH-terminal de Rab5, que se dirige a endosomas tempranos, o a los últimos 35 aminoácidos del extremo COOH-terminal de Rab7, que se une específicamente a endosomas tardíos. Siguiendo esta estrategia experimental se mostró que las sustituciones de los extremos COOH eran suficientes para dirigir la proteína quimera Rab2/Rab5 y Rab2/Rab7 a endosomas tempranos o tardíos, respectivamente (Chavrier *et al.*, 1991). Sin embargo, en estudios posteriores se sugirió que el mecanismo responsable de la especificidad de la unión de proteínas Rab a sus correspondientes membranas diana es más complejo e incluye, además del dominio hipervariable, determinantes localizados en regiones fuera de este dominio (Ali *et al.*, 2004; Stenmark *et al.*, 1994). Las marcas singulares del dominio COOH-terminal de las proteínas Rab son los motivos CC, CXC (*i.e.* proteínas Rab-CXC) o CAAX (*i.e.* proteínas Rab-CAAX), donde C es cisteína, A es un residuo alifático y X puede ser cualquier aminoácido. Las proteínas Rab-CXC, el grupo más abundante, sufren una modificación post-traducciona que consiste en la adición covalente de dos isoprenoides geranylgeranilo (20 carbonos) a los residuos de cisteína del extremo COOH, lo que es necesario para que estas GTPasas se asocien a las membranas celulares para llevar a cabo sus funciones específicas (Lane y Beese, 2006; Leung *et al.*, 2006). Esta reacción enzimática es catalizada por la geranylgeranyl-transferasa de tipo II (*i.e.* RabGGT, también conocida como RGGT), y sólo ocurre cuando las

proteínas Rab se encuentran formando complejo con una proteína accesoria conocida como *Rab escort protein* (*i.e.* REP) (Farnsworth *et al.*, 1994). Se han propuesto dos posibles modelos de la prenilación de las proteínas Rab. El primero sugiere que las proteínas Rab recién traducidas se unen a REP y, entonces, el complejo es reconocido por RabGGT. Tras la adición de los motivos geranilgeranilo a los residuos de cisteína del extremo COOH, RabGGT se disocia de REP, quedando el complejo formado por la proteína Rab unida a REP. En una hipótesis alternativa, se propone que RabGGT y REP formarían complejo antes de su unión a las proteínas Rab. Después de la prenilación de la GTPasa, RabGGT se disociaría de REP/Rab, y REP escoltaría a la proteína Rab prenilada hacia la membrana diana (Alexandrov *et al.*, 1994; Andres *et al.*, 1993; Thoma *et al.*, 2001; Thoma *et al.*, 2001). En el caso de las proteínas Rab-CAAX, que son menos abundantes que las anteriores (Rab8, Rab13, Rab18, Rab23 y Rab38), después de la traducción de la proteína, la RabGGT, en presencia de REP, añade un único grupo geranilgeranilo al dominio COOH-terminal. Estas proteínas Rab mono-geranilgeraniladas necesitan un paso adicional de procesamiento antes de ser dirigidas a sus membranas diana, que consiste en la adición de un grupo metilcarboxilo en la cisteína prenilada gracias a la acción secuencial de dos metiltransferasas localizadas en la membrana de RE (Leung *et al.*, 2007). Aunque las proteínas Rab-CXC di-geranilgeraniladas también necesitan ser metiladas para su correcto direccionamiento, sólo es necesaria una metiltransferasa de RE para catalizar esta reacción (Leung *et al.*, 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, la activación de las proteínas Rab mediante el intercambio de GDP por GTP conlleva cambios conformacionales importantes en la estructura terciaria de estas proteínas que definen su especificidad. Este intercambio de GDP por GTP está catalizado por los factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (*i.e.* GEFs), que debilitan la interacción de GDP con la proteína Rab y facilitan su liberación y la subsecuente unión de GTP (Vetter y Wittinghofer, 2001). La existencia de un gran número de proteínas GTPasas implica la existencia consiguiente de GEFs diferentes que aseguren la especificidad del proceso. Hasta ahora, todas las GEFs que se han caracterizado comparten marcas distintivas en sus secuencias, como dominios del tipo Vsp9, Sec2 o Mss4 (Delprato *et al.*, 2004; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2010; Yu y Schreiber, 1995). Con respecto a los mecanismos de acción mediante los cuales las GEFs son capaces de facilitar el intercambio GDP/GTP, aunque se usan diversas estrategias, en todos los casos la

interacción de GEF con la proteína Rab perturba la conformación molecular de los interruptores I y II. Este cambio produce la obstrucción estérica de la región de unión a Mg^{2+} , esencial para que GDP se una con alta afinidad a la molécula. La elevada proporción de GTP/GDP existente en el citosol permite que el GTP se una con rapidez a la proteína Rab y la subsecuente activación y translocación de ésta a su correspondiente compartimento diana correspondiente. La actividad de las proteínas GEF está estrechamente controlada por interacciones proteína-proteína y proteína-lípido, por su unión a segundos mensajeros o por modificaciones post-traduccionales, por lo que estos procesos se consideran claves para la coordinación espacio-temporal del transporte de endomembranas mediado por proteínas Rab. Entre la larga lista de Rab GEFs descubiertos hasta hoy, se pueden mencionar como ejemplos Mon1, que actúa como GEF de Rab7 y de su homólogo en levaduras Ypt7 tras su activación por Ccz1 (Nordmann *et al.*, 2010), TRAPP-I, que promueve la activación de Ypt1p en levaduras y Rab1 en células de mamífero en la superficie de vesículas de transporte entre el RE y el complejo de Golgi (Sacher *et al.*, 2008), Sec2p, que actúa como GEF de las proteínas Rab de levadura Ypt32p y Sec4p de manera secuencial en las etapas tempranas de la ruta secretora (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2010), y Rabex-5, que activa Rab5 en endosomas tempranos, proceso necesario para que se produzca la fusión de membranas (Delprato *et al.*, 2004).

Aunque las proteínas Rab son GTPasas, su capacidad para hidrolizar GTP es de hecho muy reducida y, por tanto, requieren la ayuda de un grupo de proteínas conocidas como *GTPase-activating proteins* (*i.e.* GAPs) para acelerar y hacer eficiente este proceso. Las proteínas GAP pertenecen a una familia muy heterogénea de proteínas cuyos miembros sólo presentan en común un dominio TBC1, aunque la especificidad de sustrato de las enzimas no parece residir en esta secuencia (Barr y Lambright, 2010). Se ha sugerido que las proteínas GAP se unen a proteínas Rab particulares debido a su localización subcelular específica que puede determinar la interacción de las proteínas GAP con proteínas reguladoras concretas. Por ejemplo, TBC1D20 es una proteína que se localiza en la membrana del RE y, por ello, sólo es capaz de unirse a proteínas Rab presentes en este compartimento (Haas *et al.*, 2007). Por otra parte, Gyp7p sólo actúa sobre la proteína Rab de levaduras Ypt7p en la presencia de la proteína quinasa Yck3 (Brett *et al.*, 2008). Al igual que las GEFs, las GAPs se encuentran también altamente reguladas. Su actividad está estrechamente controlada por interacciones con proteínas y lípidos reguladores, por segundos

mensajeros y por modificaciones post-traduccionales, lo que pone de manifiesto la importancia de estas proteínas en la coordinación de la respuesta celular mediada por proteínas Rab (Barr y Lambright, 2010).

Finalmente, otras proteínas también juegan papeles importantes en la modulación de la actividad de las proteínas Rab. Las proteínas denominadas *Rab GDP dissociation inhibitor* (i.e. RabGDI) previenen la liberación de GDP, estabilizando a la proteína Rab en su forma inactiva, mientras que los *GDI displacement factors* (i.e. GDF) reconocen a complejos Rab-RabGDI específicos y promueven la liberación de GDI y la subsecuente unión de GEF a la proteína Rab (Pfeffer y Aivazian, 2004). En cuanto a GDI, sólo se han identificado dos isoformas en células humanas: RabGDI1 (RabGDI α), cuya expresión está restringida al tejido nervioso, y RabGDI2 (RabGDI β), que se expresa de manera ubicua (Alory y Balch, 2001). Las moléculas de RabGDI y REP tienen regiones que presentan alta homología de secuencia y, tal como se ha explicado, comparten el hecho de que ambas proteínas se unen a proteínas Rab inactivas. Sin embargo, mientras que RabGDI presentan alta afinidad por las formas preniladas de proteínas Rab-GDP, las proteínas REP sólo interactúan con las formas no preniladas (Goody *et al.*, 2005). Por otra parte, la primera GDF identificada fue la proteína de levaduras Yip1, que interactúa con las proteínas Rab Ypt1 e Ypt31 (Yang *et al.*, 1998). En estudios posteriores, se han descubierto otros miembros de la familia de proteínas Yip. Todas ellas son proteínas transmembrana que presentan tanto el dominio COOH-terminal como el NH₂-terminal orientados hacia el citosol (Calero y Collins, 2002; Calero *et al.*, 2002). Un escrutinio de la base de datos genéticos ha identificado 16 posibles Yips en humanos, lo que supone que

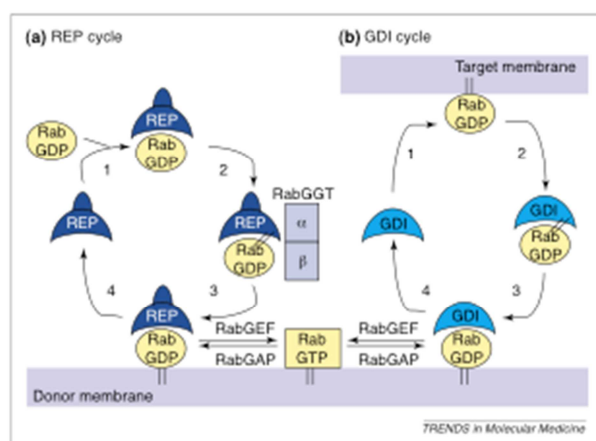


Figura 5: Rab escort protein (REP) y GDP-dissociation inhibitor (GDI) median la asociación de las proteínas Rab con la membrana. (a) Intrínsecamente, las proteínas Rab son solubles y requieren una modificación post-traduccional, que consiste en la adición de grupos isoprenoides a sus extremos COOH-terminal. Las proteínas Rab recién sintetizadas se asocian con REP y forman un complejo estable (1). El complejo es sustrato de la enzima geranilgeranil transferasa (RabGGT), que ancla grupos geranilgeranilo a residuos de Cys del extremo COOH de las proteínas Rab (2). Después de la transferencia del lípido, se propone que REP ayuda a la proteína Rab prenilada a asociarse a la membrana diana (3) y se recicla para poder unirse a otras Rabs de nueva síntesis (4). En ausencia de REP o RabGGT, las

proteínas Rab se mantienen citosólicas e inactivas. (b) Se piensa que GDI recupera a las proteínas Rab de la membrana diana (1) y las mantiene en su estado unido a GDP (inactivo) en el citosol mediante la formación de un complejo estable RabGDI/Rab (2). RabGDI transporta a la proteína Rab a la membrana donadora (3) y entonces se recicla al citosol (4) de manera que el ciclo puede volver a comenzar. Las dos proteínas, REP y GDI, se unen específicamente a las formas de las proteínas Rab unidas a GDP. Después de la disociación de la proteína Rab de GDI o REP, factores intercambiadores de nucleótidos específicos (GEF) reemplazan GDP por GTP en la molécula, activando así las proteínas Rab que reclutan efectores concretos a la vez que se impide el desanclaje de la proteína Rab de la membrana diana. Tomado de Seabra et al., Trends Mol. Med., 2002.

cada Yip puede interactuar con varias proteínas Rab (Pfeffer y Aivazian, 2004). En la Figura 5 se muestra un resumen de los factores reguladores de la actividad de las GTPasas Rab.

En cuanto a su función como reguladores del transporte intracelular de cargo, se ha sugerido que las proteínas Rab pueden actuar como intermediarios en la interacción de la proteína motora con el *cargo*. Existen numerosos ejemplos de proteínas Rab que interactúan directa o indirectamente con proteínas motoras (Hammer y Wu, 2002; Yoshida *et al.*, 2011). Rab27A es, quizás, el miembro de la familia de proteínas Rab mejor conocido en relación a su asociación con una proteína motora y por su papel en la ruta de secreción. Así, se ha demostrado que Rab27A en complejo con Slac2-a/melanofilina recluta a la miosina Va hacia los melanosomas, lo que resulta en el anclaje de éstos a filamentos de actina y el mantenimiento correcto de su distribución cercana a la periferia celular de los melanocitos (Kuroda *et al.*, 2005). Además de Slac2-a/melanofilina, Rab27A también se une a otras proteínas efectoras, responsables últimas del efecto de Rab27A en la ruta de secreción regulada. Concretamente, cuando Rab27A recluta al complejo efector *synaptotagmin-like protein 4-a* (*i.e.* Slp4-a)/granofilina-A, las células neuroendocrinas PC12 reducen dramáticamente su tasa de secreción hormonal (Tsuboi y Fukuda, 2006), mientras que cuando Rab27A se une al efector rabfilina, la tasa de secreción aumenta enormemente (Tsuboi y Fukuda, 2005). En el caso de Rab3, que se une al motor quinesina a través de su interacción con la proteína efectora DENN/MADD (Niwa *et al.*, 2008), se ha demostrado que su función es crítica para la ruta de secreción regulada en células endocrinas y neuronas, ya que las células β pancreáticas de ratones *knock-out* de Rab3A muestran una secreción de insulina dañada (Yaekura *et al.*, 2003) y la sobreexpresión de Rab3A aumenta la tasa de secreción de α -MSH en células melanotropas de rata (Rupnik *et al.*, 2007). Sin embargo, en células cromafines bovinas se ha mostrado que Rab3A inhibe la exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Johannes *et al.*, 1994), lo que sugiere que, aunque diferentes tipos celulares

comparten maquinarias moleculares que regulan la ruta de secreción, pequeñas diferencias en las moléculas accesorias que interaccionan con los factores comunes pueden determinar resultados incluso opuestos en la tasa de secreción neta.

1.2.3.- Características estructurales y funcionales de Rab18

Durante los últimos años, nuestro laboratorio se ha centrado en estudiar las características bioquímicas y funcionales de la proteína Rab18, lo que nos ha permitido descubrir que, al igual que Rab27A y Rab3A, esta GTPasa también participa en la ruta de secreción regulada. Rab18 se clonó inicialmente a partir de células AtT20 de hipófisis de ratón en el contexto de una estrategia encaminada a clonar los miembros de la familia de proteínas Ran en hipófisis de roedores (Yu *et al.*, 1993). La secuencia de cDNA aislada codifica para una proteína de 23.5 kDa que presenta un dominio consenso de unión a GTP y otros motivos típicos de la familia de proteínas Rab (Yu *et al.*, 1993). Los análisis de *northern blot* mostraron que Rab18 se expresa de manera ubicua, aunque su expresión es más prominente en tejidos neuroendocrinos, incluyendo el cerebro y la hipófisis (Yu *et al.*, 1993). En 2005, Kukimoto-Niino y colaboradores publicaron por primera vez la estructura cristalográfica de la proteína Rab18 humana (DOI: 10.2210/pdb1x3s/pdb; Figura 6), lo que confirmó su alta homología estructural con otros miembros de la familia Rab.

El dominio hipervariable COOH-terminal de Rab18 contiene el motivo aminoacídico CAAX, lo que apunta a que esta GTPasa es mono-prenilada por RGGT en presencia de REP (probablemente REP-1). Después de la prenilación, Rab18 es modificada post-traduccionalmente mediante la adición de grupos carboxil-metilo en el dominio hipervariable de la proteína, reacción que tiene lugar en subdominios especializados de la membrana del RE enriquecidos en las enzimas metil-transferasas *Icmt* y *Rce1* (Leung *et al.*, 2007). Tras la metilación, Rab18 es liberada al citosol donde puede comenzar a ciclar entre su conformación citosólica inactiva (unida a GDP) y su conformación activa asociada a membrana (unida a GTP). Por analogía con los datos obtenidos a partir de otras proteínas Rab de la familia, es razonable pensar que el ciclo GDP-GTP de Rab18 esté regulado por proteínas GEFs, GAPs, GDIs y GDFs específicas, aunque hasta el momento no se ha identificado ninguna de estas proteínas.

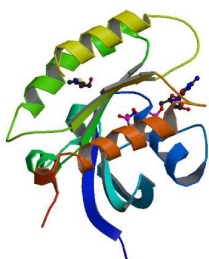


Figura 6: Estructura cristalográfica de Rab18 humano en complejo con Gppnhp a una resolución de 1.32 Å. Estructura obtenida mediante difracción de rayos X a una temperatura de 100 K. Kukimoto-Niino et al., DOI:10.2210/pdb1x3s/pdb.

En cuanto a la localización intracelular de Rab18, estudios de microscopía confocal y electrónica en células epiteliales de riñón detectaron que la inmunoseñal de Rab18 se distribuía predominantemente en estructuras tubulo-vesiculares próximas al borde en cepillo apical de las células tubulares proximales (Lutcke *et al.*, 1994). Dado que estas estructuras eran muy similares a los túbulos apicales densos implicados en el reciclaje de la membrana apical y en la transcitosis características de células epiteliales, estos autores sugirieron que Rab18 podría estar implicada en la endocitosis de reciclaje (Lutcke *et al.*, 1994). Sin embargo, en un estudio posterior orientado a caracterizar cómo *Salmonella* escapa de la ruta lisosomal durante su endocitosis en macrófagos se mostró que la bacteria evita la ruta endocítica acumulándose en un compartimento especializado enriquecido en Rab18, pero carente de marcadores típicos de endosomas tempranos o tardíos, como la transferrina y Rab7, respectivamente (Hashim *et al.*, 2000). Más recientemente, estudios llevados a cabo en adipocitos, fibroblastos y células neuroendocrinas han sido también incapaces de localizar Rab18 en endosomas tempranos o tardíos (Dejgaard *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011; Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). En cambio, Rab18 colocalizó con marcadores de gotas lipídicas en adipocitos 3T3-L1 (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011), de gránulos de secreción en células (neuro)endocrinas PC12, AtT20 y melanotropas (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007), y de los compartimentos *cis*-Golgi y RE en fibroblastos NRK, Vero y COS7 (Dejgaard *et al.*, 2008). En conjunto, estas observaciones indican que la localización intracelular de Rab18 depende fuertemente del tipo celular considerado, lo que sugiere que esta GTPasa puede cumplir distintas funciones que dependen de la especialización celular y de su posible interacción con proteínas efectoras diferentes.

En lo que respecta a la función de Rab18 en la ruta de secreción regulada, un análisis genético diferencial que se llevó a cabo en nuestro laboratorio utilizando células melanotropas del lóbulo intermedio de la hipófisis de anfibios nos permitió aislar el gen que codifica esta proteína en virtud de su expresión preferencial en una subpoblación de células que presentan una tasa de secreción hormonal reducida (Malagon *et al.*, 2005). Por otra parte, los estudios de localización subcelular de

Rab18 en líneas celulares (neuro)endocrinas, como las células PC12 y AtT20, así como las células melanotropas productoras de α -MSH, mostraron que la GTPasa se encuentra principalmente difusa en el citosol en condiciones basales, mientras que tras la estimulación específica de la actividad secretora celular, la proteína colocaliza con los marcadores específicos de gránulos de secreción SgII, CgA y el neuropeptido Y (NPY). Sin embargo, no se consiguió observar colocalización de Rab18 con Rab3A, que, como se ha comentado previamente, modula la exocitosis mediante su asociación a vesículas secretoras durante la fase de *docking* (Fischer von Mollard *et al.*, 1991; Holz *et al.*, 1994; Johannes *et al.*, 1998; Johannes *et al.*, 1994; Martelli *et al.*, 2000; Regazzi *et al.*, 1996; Schluter *et al.*, 2004). A partir de estos datos, sugerimos que Rab18 cicla entre el citosol y la superficie de una población discreta de gránulos de secreción en respuesta a la activación de la ruta de secreción regulada (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). La distribución intracelular de mutantes de Rab18 confirmó esta idea. Así, mediante mutagénesis dirigida construimos dos mutantes de Rab18 que presentan sustituciones de aminoácidos específicos en la plataforma de unión a GTP, un mutante, Rab18(S22N), es deficiente en la unión de GTP y por lo tanto, constitutivamente inactivo, mientras que el segundo, Rab18(Q67L), es incapaz de hidrolizar GTP incluso con la ayuda de GAPs y, como consecuencia, está activado de manera constitutiva. Experimentos de transfección de células PC12 y AtT20 con las proteínas mutantes demostraron que el mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L) se encontraba unido a gránulos de secreción en condiciones basales y estimuladas, mientras que el mutante constitutivamente inactivo Rab18(S22N) permanecía en el citosol incluso tras la estimulación de la secreción hormonal (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). En definitiva, al igual que ocurre para otras proteínas Rab, el intercambio de GDP por GTP en Rab18 se requiere estrictamente para que tenga lugar la translocación de la GTPasa a su compartimento diana.

Una importante observación para comprender el papel específico de Rab18 en células (neuro)endocrinas fue que la translocación de la proteína a gránulos de secreción estaba acompañada de una reducción de la respuesta secretora de las células a estímulos extracelulares. En concreto, cuando Rab18 silvestre o el mutante constitutivamente activo eran sobreexpresados en células PC12, la tasa de secreción de dopamina en respuesta a un pulso despolarizante de K^+ resultó significativamente menor que en las células control (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). Este efecto

inhibitorio se observó también a nivel de células individuales mediante el uso de un marcador específico del ciclo exocítico-endocítico, el fluoróforo FM5-95 (Brumback *et al.*, 2004; Cochilla *et al.*, 1999).

En el caso de las células AtT20 productoras de ACTH, la sobreexpresión de Rab18 también provocó una inhibición de la tasa de secreción en respuesta al secretagogo hipotalámico CRH, efecto cuantificado a nivel de población mediante ELISA para ACTH y a nivel de células individuales mediante la medida de la internalización de FM5-95 (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). En conjunto, estos datos son consistentes con la idea de que la interacción de Rab18 con gránulos de secreción podría actuar como un freno molecular en el tráfico de gránulos para controlar la cantidad de producto liberado en respuesta a señales extracelulares estimuladoras de la ruta de secreción regulada. En línea con estas observaciones, experimentos de video-microscopía en células vivas revelaron que las vesículas asociadas a Rab18 presentaban una movilidad reducida en comparación con el movimiento medio de la población de gránulos de secreción. Específicamente, en células transfectadas con NPY fusionado con GFP, la mayoría de los gránulos que contienen el péptido de secreción mostraban recorridos largos ($> 2 \mu\text{m}$) y dirigidos (movimiento anterógrado), mientras que en las células transfectadas con Rab18, los gránulos positivos para la GTPasa presentaban trayectorias cortas ($< 2 \mu\text{m}$) y restringidas a una región intracelular concreta (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). Estos datos sugieren que la presencia de Rab18 en la superficie de gránulos de secreción afecta al transporte de gránulos de secreción. Rab18 podría llevar a cabo esta función mediante la modulación de la actividad de proteínas motoras por la interacción directa o indirecta con estas proteínas y la formación de complejos junto con proteínas efectoras aún desconocidas que determinaran, en última instancia, la capacidad de transporte de las proteínas motoras. De hecho, se ha demostrado que otros miembros de la familia de proteínas GTPasas Rab afectan a la ruta secretora mediante mecanismos similares. Por ejemplo, se ha mostrado que Rab6 se asocia al motor dependiente de microtúbulos Rabkinesin-6, promoviendo así la transferencia de vesículas entre el complejo de Golgi y el RE (Echard *et al.*, 1998), Rab4A interacciona con la cadena ligera de la dineína y modula su actividad (Bielli *et al.*, 2001) y Rab27A se une a la proteína efectora melanofilina, lo que determina su interacción con el motor dependiente de actina, miosina Va, para promover la secreción de los melanosomas

(Fukuda *et al.*, 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, otras proteínas Rab modulan el proceso de exocitosis dependiente de Ca^{2+} en células (neuro)endocrinas, gracias a su interacción directa con vesículas de secreción. Concretamente, Rab27A promueve la secreción estimulada en células PC12 (Fukuda *et al.*, 2002), mientras que Rab3A (Fischer von Mollard *et al.*, 1991; Johannes *et al.*, 1998; Johannes *et al.*, 1994) y Rab11 (Khvotchev *et al.*, 2003) regulan negativamente la secreción en neuronas. Rab3A también inhibe la liberación de gránulos de secreción en células β pancreáticas (Regazzi *et al.*, 1996) y en células cromafines de la médula adrenal (Holz *et al.*, 1994). Sin embargo, aunque Rab3A y Rab18 se co-expresan en células (neuro)endocrinas y parecen cumplir funciones similares, restringiendo la liberación de gránulos de secreción, no se encuentran presentes en la misma población de gránulos de secreción, lo que apoya la idea de que estas dos GTPasas actúan en diferentes etapas del proceso secretor. Rab3A se ha encontrado en la superficie de gránulos que se localizan muy cerca de la membrana plasmática, lo que sugiere que esta GTPasa participa en las etapas finales de la ruta de secreción (*i.e.* anclaje y/o fusión de gránulos con la membrana plasmática) (Martelli *et al.*, 2000; Schluter *et al.*, 2004). Por su parte, el análisis ultraestructural de gránulos positivos para Rab18 reveló que estos se localizan a cierta distancia de la membrana plasmática, por lo que es improbable que estos gránulos se encuentren en fase de anclaje o fusión y, por tanto, Rab18 participaría en etapas tempranas de la ruta de secreción (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). Sin embargo, hoy en día se desconocen los mecanismos mediante los cuales Rab18 modula negativamente el transporte de gránulos de secreción y, por tanto, la secreción hormonal.

1.2.4.- Las proteínas Rab en enfermedades humanas

Existen cada vez más evidencias experimentales que relacionan disfunciones en la producción y/o actividad de proteínas Rab o sus proteínas efectoras con la aparición de ciertas enfermedades. El síndrome de Griscelli (*i.e.* GS) de tipo 1 fue la primera enfermedad humana que se relacionó directamente con una proteína Rab, en concreto, con la aparición de un mutante no funcional de Rab27A (Menasche *et al.*, 2000). Esta enfermedad es un desorden autosomal recesivo que resulta en la dilución del pigmento melanina en la piel y el pelo, debido a la acumulación de los melanosomas

en los melanocitos, y en diferentes grados de inmunodeficiencia, causados por la activación descontrolada de células T y macrófagos (Menasche *et al.*, 2000). Otro tipo de síndrome de Griscelli, el GS de tipo 2, es consecuencia de una mutación en el efector de Rab27A miosina Va. Estos pacientes presentan defectos neurológicos primarios, pero, a diferencia de los pacientes con GS de tipo 1, muestran una función inmunológica normal (Menasche *et al.*, 2000). Otra enfermedad humana relacionada con proteínas Rab es la neuropatía de Charcot-Marie-Tooth de tipo 2B. Es un desorden autosomal dominante caracterizado por pérdida sensorial, debilidad en los músculos distales y frecuentes infecciones en los pies y los dedos de los pies (Young y Suter, 2003). Hoy en día, se han identificado 4 mutaciones diferentes en el gen de Rab7 asociadas a esta enfermedad. Todas ellas dan lugar a proteínas Rab7 mutantes constitutivamente activas que son incapaces de hidrolizar GTP, lo que conlleva alteraciones graves en el transporte axonal retrógrado y, en particular, en el tráfico de neurotrofinas y la señalización mediada por ellas (Cogli *et al.*, 2009).

Las mutaciones en proteínas reguladoras de la actividad de las GTPasas Rab también suponen cambios profundos en el funcionamiento celular. Por ejemplo, mutaciones de pérdida de función de la proteína REP-1 provocan la aparición de la coroidoremia, un tipo de degeneración retinal asociada al cromosoma X y caracterizada por un exceso de Rab27A no prenilada en las células epiteliales pigmentarias de la retina (Seabra, 1996). Por su parte, mutaciones en la proteína RabGDIa se han relacionado con la aparición de retraso mental no específico asociado al cromosoma X (D'Adamo *et al.*, 1998). Este mutante conduce a una reducción anormal del reciclaje de Rab3A en la sinapsis, lo que provoca serios defectos en la liberación de neurotransmisores que afectan gravemente al desarrollo del sistema nervioso central (D'Adamo *et al.*, 1998). La proteína RabGGT también se han relacionado con una enfermedad en humanos. Concretamente, una mutación en la subunidad α causa el síndrome de Hermansky-Pudlak, un desorden autosomal recesivo raro caracterizado por la aparición de albinismo, frecuente sangrado y acumulación de lipofucsina en lisosomas (Huizing *et al.*, 2000).

La expresión alterada de proteínas Rab también ha sido asociada con diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, la expresión de Rab3 se encuentra elevada en ciertos tumores del sistema nervioso y tejidos neuroendocrinos (Culine *et al.*, 1992), así como en insulinomas (Lankat-Buttgereit *et al.*, 1994), el nivel de expresión de Rab5 parece estar proporcionalmente relacionado con el grado de malignidad y metástasis

del adenocarcinoma de pulmón (Li *et al.*, 1999), mientras que los niveles de Rab20 se encuentran anormalmente elevados en carcinomas pancreáticos (Amillet *et al.*, 2006). Rab25 es quizás el miembro de la familia de proteínas Rab mejor conocido en cuanto a su implicación en cáncer. Se han detectado niveles muy elevados de transcritos de Rab25 en diversos tipos de cáncer epitelial, como tumores de ovario y mama (Agarwal *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2004). Además, la expresión de Rab25 en estos tejidos también está relacionada con el grado de agresividad y progresión del cáncer. Se ha propuesto que la interacción directa de Rab25 con la proteína de adhesión integrina es la causa molecular que conduce a una mayor capacidad de invasión por parte de estas células tumorales (Cheng *et al.*, 2004; Subramani y Alahari, 2010).

En lo que respecta a Rab18, varios análisis de *microarray* han mostrado que la expresión del gen está desregulada en tumores neuroendocrinos gastrointestinales (Hofslie *et al.*, 2005), adenocarcinoma de próstata (True *et al.*, 2006), cáncer de mama (Yan *et al.*, 2008) y adenocarcinoma de páncreas (Kalinina *et al.*, 2010). Estos descubrimientos sugieren que Rab18 podría constituir una diana valiosa para diseñar herramientas de diagnóstico, pronóstico o terapia para estos tipos de cáncer. Sin embargo, estos estudios no profundizan en la caracterización de la relación específica de Rab18 con la patofisiología de los tumores. Como se ha comentado en apartados anteriores, en nuestro laboratorio se ha demostrado que Rab18 modula negativamente la actividad secretora de células (neuro)endocrinas. Por tanto, se podría prever que alteraciones en la expresión y/o en la actividad de esta GTPasa podrían suponer alteraciones en el proceso secretor, similares a las que ocurren en muchos desórdenes endocrinos caracterizados por la hipersecreción de una hormona determinada. Este es el caso de la acromegalia, una patología hipofisaria asociada a niveles anormalmente elevados de la hormona del crecimiento (*i.e.* GH) en plasma (Melmed *et al.*, 2002). En nuestro laboratorio, hemos demostrado recientemente que los niveles elevados de GH en plasma que presentan los pacientes con acromegalia no sólo se derivan de la hiperplasia de la población hipofisaria de células somatotropas, sino que también son consecuencia de una alteración de la actividad secretora de las células somatotropas (Vazquez-Martinez *et al.*, 2008). Estos datos nos condujeron a sugerir que las alteraciones patológicas que provocan la hipersecreción de GH podrían derivar de fallos intrínsecos en componentes moleculares relacionados con la ruta de secreción regulada. De hecho, todos los tejidos de pacientes con acromegalia que fueron analizados en este estudio presentaban niveles de expresión de Rab18 anormalmente

reducidos en comparación con lo observado en muestras de hipófisis sanas o de pacientes con adenomas hipofisarios no funcionantes que presentaban niveles normales de GH circulante. Estos resultados sugieren que la carencia de Rab18 puede ser una de las causas que desencadenan la actividad hipersecretora de las células somatotropas en este tipo de tumores. Curiosamente, experimentos de doble inmunocitoquímica y microscopía electrónica revelaron que la proporción de gránulos de secreción positivos para Rab18 en células somatotropas de pacientes con acromegalia era significativamente menor que en las somatotropas procedentes de pacientes con adenomas no funcionantes. De acuerdo con estas observaciones, el contenido de Rab18 medido por inmunofluorescencia y microscopía confocal también resultó menor en células somatotropas individuales de muestras de acromegalia. Más aún, la actividad hipersecretora mostrada por estas células tumorales se consiguió revertir sustancialmente gracias a la sobreexpresión de Rab18, lo que apunta a que la modulación de la producción de esta GTPasa puede representar un punto de control importante en el proceso de secreción hormonal de estas células. En conjunto, todos estos resultados sugerían que la expresión reducida de Rab18 en células tumorales secretoras de GH podría resultar en una pérdida parcial del control que ejerce la GTPasa sobre los mecanismos moleculares responsables de retener una población particular de gránulos de secreción y prevenir la secreción de su contenido, apoyando la relevancia de esta proteína en la función normal de las células neuroendocrinas.

Recientemente, se ha identificado una mutación que conlleva la pérdida de función de Rab18 asociada a la enfermedad autosomal recesiva Micro síndrome de Warburg (Bem *et al.*, 2011). Curiosamente, esta enfermedad también puede aparecer como consecuencia de la pérdida de actividad de dos GAPs específicas de Rab3, Rab3GAP1 y Rab3GAP2, por lo que se ha sugerido que puede existir una relación funcional entre estas dos proteínas (Bem *et al.*, 2011). En nuestros estudios previos, demostramos que los gránulos que contienen Rab18 no presentan Rab3 en su superficie y viceversa (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). Sin embargo, Rab3 y Rab18 presentan similitudes en cuanto a su función. Cuando ambas GTPasas están en su conformación activa, se unen a gránulos de secreción, lo que se traduce en una disminución neta de la capacidad de respuesta celular a estímulos secretores (Fischer von Mollard *et al.*, 1991; Johannes *et al.*, 1998; Johannes *et al.*, 1994; Vazquez-Martinez *et al.*, 2007).

2.- OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido el análisis de los mecanismos moleculares que subyacen en la función de Rab18 en relación a la ruta de secreción regulada en células neuroendocrinas, así como la identificación de las proteínas, reguladoras y efectoras, que interaccionan con esta GTPasa y que traducen su acción en el control de etapas concretas del proceso secretor. Para conseguir este objetivo general, planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Determinar la dinámica de movilización de los gránulos de secreción que incorporan Rab18 en su superficie.
- 2.- Analizar los mecanismos moleculares regulados por Rab18 y responsables de la disminución de la movilidad de los gránulos de secreción, así como la implicación de la red del citoesqueleto y de los motores moleculares en este proceso.
- 3.- Identificar las proteínas que interaccionan con Rab18 y su participación en la regulación de la actividad de la GTPasa y/o en el control del movimiento de los gránulos de secreción.
- 4.- Investigar la regulación fisiopatológica de Rab18 y de componentes específicos de su interactoma en tumores neuroendocrinos.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico.

3.1.1. Animales y obtención de tejidos.

Para llevar a cabo la clonación de los genes de interés (Rab18 y DBNDD2), se utilizaron tejidos procedentes de ratones adultos de la cepa C57BL/6 y ratas Wistar adultas (Servicio de Experimentación Animal, Universidad de Córdoba). Los animales fueron sacrificados por decapitación, siguiendo las normas y recomendaciones de manipulación y sacrificio de los animales, del Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba. Tras el sacrificio de los animales, se obtuvieron los distintos tejidos mediante disección, que se introdujeron en criotubos y se conservaron a -80° C hasta su procesamiento.

3.1.2. Líneas y cultivos celulares.

En el presente trabajo, se han utilizado dos líneas celulares: células PC12 (feocromocitoma de rata) y la línea celular COS7 (fibroblastos de riñón de mono), amablemente cedidas por los Drs. Eduardo Muñoz-Blanco y Marco Calzado (Sección de Inmunología del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba). La línea celular PC12 fue cultivada en medio DMEM conteniendo glucosa 4.5 g/l y suplementado con L-glutamina 2 mM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), suero fetal bovino al 5% (v/v) y suero de caballo (Gibco, Madrid, España) al 10% (v/v). Las células COS7 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 4.5 g/l de glucosa, L-glutamina 2 mM, solución antibiótica-antimicótica al 1% (v/v), piruvato sodico 0.1 mM y suero fetal bovino al 10% (v/v).

Los cultivos de mantenimiento de las dos líneas celulares se realizaron en botellas de cultivo de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suiza) y se despegaron (una vez a la semana en el caso de las células PC12 y dos a tres veces por semana para la línea COS7) utilizando una solución comercial conteniendo tripsina 0.5 g/l y EDTA 0.2 g/l (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Las células así obtenidas se sembraron en diferentes soportes según la finalidad del experimento en cuestión.

Así, para la línea celular PC12, las células utilizadas para microscopía confocal y de fluorescencia se sembraron a una densidad de 20,000 células/cm² sobre cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro tratados con poli-L-lisina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, Madrid, España), que fueron colocados en placas de 6 pocillos

(TPP). Por su parte, las células utilizadas para obtener extractos proteicos se sembraron a una densidad de 250,000 células/pocillo en placas de 6 pocillos (TPP). En el caso de la línea celular COS7, las células se sembraron a una densidad de 4,000 células/cm² en cubreobjetos de vidrio de 25 mm de diámetro que habían sido previamente tratados con poli-L-lisina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Los cubreobjetos fueron colocados en placas de 6 pocillos (TPP), que se procesaron con posterioridad para realizar estudios de microscopía de fluorescencia.

3.1.2.1. Transfección de cultivos celulares.

Para los experimentos de transfección destinados a estudios de microscopía confocal, las células se sembraron en cubres de vidrio de 25 mm de diámetro (20,000 células/cm²) que habían sido previamente tratados con poli L-lisina, colocándose cada cubre en una placa de 35 mm de diámetro conteniendo 1 ml de medio de cultivo. La introducción de vectores plasmídicos de expresión se llevó a cabo mediante transfección con el reactivo Lipofectamine 2000 siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se transfectaron 2 ó 3 días después de su siembra, cuando el cultivo alcanzó una densidad aproximada del 70%, usando 1 mg de ADN plasmídico y 3 µl de Lipofectamine 2000 por cada placa. La transfección se realizó en medio OptiMEM (Gibco, Madrid, España) y la mezcla se mantuvo toda la noche. Transcurrido este tiempo, se inició el procesamiento de las muestras para la aplicación de la técnica de inmunocitoquímica.

En apartados posteriores se indican las estrategias de biología molecular aplicadas para la obtención de los vectores de expresión utilizados en el presente estudio así como los vectores proporcionados por otros investigadores.

3.2. Estudios de localización intracelular mediante microscopía de fluorescencia.

La distribución intracelular de las proteínas investigadas en este estudio en células PC12 o COS7 se analizó mediante microscopía confocal de fluorescencia, aplicándose en algunos casos técnicas de inmunofluorescencia para la detección de proteínas endógenas o proteínas exógenas que no tenían un marcador fluorescente incorporado en el vector de expresión correspondiente.

Los estudios de inmunocitoquímica se llevaron a cabo tanto sobre células transfectadas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior, o sobre células no transfectadas, que fueron procesadas directamente tras 2 ó 3 días de

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

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados en los estudios de inmunocitoquímica

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por
Anti-Rab18	Conejo	1:500	Sigma-Aldrich (Madrid, España)
Anti-LAMP1	Ratón	1:100	Assay Designs (Madrid, España)
Anti- cMyc	Ratón	1:500	Cell Signaling Technology (Massachusetts, EEUU)
Anti-GDI2	Conejo	1:100	ProreinTech (Chicago, EEUU)
Anti-HTT	Cabra	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania)
Anti-cMyc	Ratón	1:750	AbD Serotec (Münsterst, Alemania)
Anti-β-actina	Ratón	1:1,000	Sigma-Aldrich (Madrid, España)
Anti-SYT4	Cabra	1:100	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania)

Para los estudios de colocalización intracelular mediante microscopía fue necesario la utilización de diferentes vectores de expresión que fueron amablemente cedidos por diferentes investigadores. En la Tabla 2 se resumen los vectores cedidos con el proteína de interés y el gen reportero, y las personas que los cedieron.

Tabla 2: Vectores de expresión utilizados en los estudios de localización intracelular. *Se indica la posición en la que se localiza la proteína de interés con respecto al gen reportero.

<i>Nombre</i>	<i>Vector</i>	<i>Tag y posición*</i>	<i>Proporcionado por</i>
HTT	pCMV-Neo-Bam	No	Dr. Jordi Alberch (Universidad de Barcelona, España)
pEYFP-1301-17Q	peYFP	YFP (3')	Dr. Frederic Sadou (Institut Curie Francia)
cMyc-P150 ^{Glued}	PCDNA3	cMyc (3')	Dra. Erika Holzbour (Universidad de Pennsylvania, EEUU)
CFP-KLC	pmCFP	mCFP (3')	Kristen verhey (Universidad de Michigan, EEUU)
cMyc-Pallidin	PCDNA3.1	cMyc (3')	Dr. Juan S. Bonifacino, ational Institutes of Health, Bethesda, EEUU
KIF5C-GFP	pEGFPC3	GFP (3')	Dra. Michelle Peckham, Universidad de Leeds, Reino Unido

3.3. Estudios de movimiento intracelular mediante video microscopía de fluorescencia en tiempo real.

Para ver el posible efecto de Rab18 sobre la dinámica de movimiento de los las proteínas motoras y los gránulos de secreción en respuesta a estímulo con KCl, se utilizó la video-microscopía en tiempo real sobre células vivas PC12 y COS7 y se monotorizaron las células transfectadas con el vector de expresión de NPY-GFP o la proteína motora GFP-KIF5C. Así, se transfectaron las células con DsRed-Rab18 o la proteína DsRed-GDI2, y se analizó el patrón de de movimiento de las vesículas de secreción con NPY-GFP o de la proteína motora KIF5C antes y tras un pulso despolarizante de K⁺. Las células transfectadas se visualizaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000 E (Nikon, Tokio, Japón), acoplado a una cámara Hamamatsu ORCA II BT (Hamamatsu City, Japón), controlado con el programa MetaMorph (Universal Imaging Corp., West Chester, PA, EEUU). Se tomaron imágenes cada 3 segundos de acoplada a la proteína de interés, de manera que se cogieron imágenes durante 150 s antes de hacer un tratamiento con KCl 53 mM (50 imágenes) y otras 50 imágenes tras el tratamiento. También se hizo una imagen de

referencia de la transfección con Dsred-Rab18 o DsRed-GDI2. Las imágenes se procesaron con el programa DIATRACK (Semasopht, North Epping, Australia) de que analizaron los parámetros de movimientos de las vesículas; velocidad, coeficiente de difusión y la trayectoria.

3.4. Estudios bioquímicos mediante *Western blotting*.

3.4.1. Obtención de extractos proteicos.

Para el análisis de proteínas mediante *western blotting* se obtuvieron extractos de los cultivos celulares utilizando tampón de extracción RIPA [Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1% (v/v), deoxicolato sódico 1% (m/v), SDS 0.1% (m/v), pH 7,4] suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0.1 mM, quimostatina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml, antipaina 5 µg/ml, pepstatina A 5 µg/ml). Los cultivos celulares se lavaron dos veces con PBS 0.01 M pH 7.4 para eliminar restos de medio de cultivo y las células se rasparon en un volumen adecuado de tampón de extracción (entre 50 y 100 µl). Posteriormente, los homogenados se incubaron durante 30 min en hielo y se sometieron a sonicación durante 2 min. Finalmente, los homogenados se centrifugaron a 9,000 x g durante 5 min a 4° C para eliminar restos celulares y los sobrenadantes se conservaron a -20° C hasta su análisis. Todos los lavados e incubaciones se realizaron sobre hielo para minimizar la degradación de las proteínas.

3.4.2. Fraccionamiento proteico mediante centrifugación.

Para el aislamiento de las fracciones celulares citosólica y de membrana de células PC12, se adaptó el método descrito por Yang y colaboradores basado en la centrifugación a equilibrio de gradientes continuos de sacarosa (Yang *et al.*, 2001). Así, células PC12 crecidas a confluencia en placas de 10 cm de diámetro se rasparon en 1.5 ml de tampón de lisis (Sacarosa 250 mM, HEPES 4 mM, EDTA 1.5 mM, pH 7.4) conteniendo inhibidores de proteasas, y se lisaron en un homogeneizador vidrio-vidrio durante 30 s. La homogeneización se completó haciendo pasar el lisado 20 veces a través de una aguja 25-G. Los núcleos y las células no lisadas se eliminaron mediante centrifugación a 800 x g durante 10 min a 4° C. La pella resultante se resuspendió en 1.5 ml de tampón de lisis y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones.

A continuación, los sobrenadantes de las dos centrifugaciones se juntaron y se centrifugaron a 1,000 x g durante 10 min a 4° C. El sobrenadante post-nuclear así obtenido (fracción PNS) se centrifugó a 165,000 x g durante 2 horas a 4° C en un rotor SW60 (Beckman Coulter) para obtener la fracción cruda de membrana en la pella (fracción P165) y la fracción citosólica en el sobrenadante (fracción S165). La pella fue resuspendida en 150 µl de tampón de lisis y la distribución de las distintas proteínas en las tres fracciones (PNS, S165 y P165) fue analizada mediante *Western blotting* utilizando 50 µg de proteína para cada una de las fracciones.

3.4.3. Precipitación de proteínas mediante el método Cloroformo/ Metanol.

La precipitación de proteínas mediante el método cloroformo/metanol, utilizada en diferentes experimentos, permite la eliminación de restos de sales y detergentes de la muestra. Para ello, y por cada 100 µl de muestra, se añaden por orden sucesivo 400 µl de metanol, 100 µl de cloroformo y 300 µl de agua, mezclando siempre mediante vortex tras cada paso. La mezcla se centrifuga durante 1 minuto a 14,000 g y se elimina la capa acuosa superior. Posteriormente, se añade de nuevo 400 µl de metanol y se centrifuga 2 minutos a 14,000 g. Finalmente, se eliminan los restos de metanol y se deja secar la pella a temperatura ambiente. La pella se resuspende en 40 µl de tampón de carga 1.5 X para su posterior análisis por *Western blotting*.

3.4.4. Electroforesis desnaturizante y electrotransferencia.

Tras la obtención de los diferentes extractos y fracciones proteicas, se determinó la concentración de proteína total en los mismos por el método de Bradford (Bradford, 1976), mezclando 50 µl de NaOH 50 mM con 2 µl de muestra y 1 ml del reactivo de Bradford. Tras 10 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se determinó el valor de densidad óptica (DO) a 590 nm mediante espectrofotometría. La cantidad total de proteína del extracto se determinó utilizando este valor en una recta patrón.

Posteriormente, las muestras se prepararon para su separación electroforética mezclando cuatro volúmenes del extracto proteico y un volumen de tampón de carga 5 X [Tris-HCl 500 mM, SDS 7.5 % (m/v), EDTA 10 mM, sacarosa 50% (m/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), DTT 250 mM, azul de bromofenol 5 mg/ml, pH 6.8], se hirvieron durante 5-10 min para desnaturizar las proteínas de la muestra y, finalmente, se centrifugaron a 8,000 x g durante 5 min a 4° C para eliminar restos

insolubles. Una vez preparado el extracto proteico, en torno a 75 µg de proteína se sometieron a electroforesis desnaturizante en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, Madrid, España).

Dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar, la electroforesis se realizó en un gel con un porcentaje de poliacrilamida del 7.5, 10 ó 12.5%. La migración se llevó a cabo a un voltaje constante de 120 V hasta que el frente de migración llegó al final del gel. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Corp., Pensacola, FL, EEUU). La transferencia transcurrió a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora y con recirculación continua del tampón de transferencia [Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS al 0.2% (m/v), metanol al 20% (v/v)]. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se tiñó con Rojo Ponceau [Ponceau S al 0.1% (m/v) en ácido acético al 1% (v/v)] durante 5 min para comprobar que la transferencia había sido correcta y para visualizar el conjunto de bandas.

3.4.5. Inmunodetección y análisis densitométrico.

Las membranas fueron desteñidas y bloqueadas durante 1 hora con tampón de bloqueo [TBS (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5), Tween-20 al 0.05% (v/v) y leche desnatada en polvo al 5% (m/v)]. Después, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en tampón de bloqueo durante toda la noche a 4° C. Las características de los diferentes anticuerpos primarios utilizados se indican en la Tabla 3. A continuación, las membranas se lavaron tres veces durante 15 min con tampón de lavado [TBS conteniendo Tween-20 al 0.05% (v/v)] y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y diluido en tampón de bloqueo. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con tampón de lavado durante 15 min y dos veces con TBS durante 5 min.

El revelado de la peroxidasa se realizó con un kit basado en quimioluminiscencia (ECL-Plus, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) y películas autoradiográficas (BioMax XAR Kodak, Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Tras el revelado, las películas se escanearon y las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa ImageJ 1.41 (NIMH, Bethesda, Maryland, EEUU). En los casos en los que se llevó a cabo un análisis cuantitativo de las bandas inmunorreactivas, se determinó la densidad óptica de las mismas utilizando el

programa ImageJ 1.41. Para normalizar la carga de proteína en las diferentes calles, se realizó la inmunotinción contra β -actina, y la densidad óptica para la proteína de interés se refirió a aquella de la β -actina. En aquellos casos en los que la normalización con β -actina no se pudo realizar, ésta se llevo a cabo en relación con la densidad óptica resultante de la tinción con Rojo Ponceau en cada calle.

Tabla 3: Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de *Western blotting*.

Nombre	Origen	Dilución	Proporcionado por/referencia
Anti-GDI2	Conejo	1:200	Proteintech (Manchester, EEUU)
Anti-GM130	Ratón	1:1,000	BD Biosciences (Madrid, España)
Anti-cMyc	Ratón	1:1,000	AbD Serotec (Oxford, Reino Unido)
Anti- β -actina	Ratón	1:50,000	(Sigma-Aldrich, Madrid, España)
Anti-Rab18	Conejo	1:1,000	(Sigma-Aldrich (Madrid, España)
Anti-HTT	Cabra	1:500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Alemania)
Anti-GFP	Conejo	1:1,000	Cell Signaling Technology (Massachusetts, EEUU)
Anti-cMyc	Conejo	1:750	Cell Signaling Technology (Massachusetts, EEUU)

3.5. Estudios de clonación y expresión.

3.5.1. Obtención de ácidos nucleicos.

Todo el material empleado en los estudios de expresión génica fue manipulado siempre con guantes y tratado previamente con NaOH 5 N preparado con H₂O-DEPC (dietil-etil-pirocarbonato; 1 μ l/ml, Sigma-Aldrich, Madrid, España) para eliminar la posible actividad ARNasa, y posteriormente lavado varias veces con agua tratada con DEPC.

El cDNA correspondiente a la región codificante de las proteínas de interés se sintetizó a partir de ARN total de testículo de raton en el caso de Rab18, o cerebro de rata para DBNDD2.

El aislamiento del ARNm total de las muestras se llevó a cabo a partir de 1 g de cada tejido, utilizando un homogeneizador mecánico y el reactivo Trizol (Invitrogen, Barcelona, España), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Concretamente, a cada muestra de cerebro y de testículo, se le añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol añadido inicialmente. La mezcla se incubó a temperatura ambiente

durante 2-3 min, tras lo cual se centrifugó a 12,000 x g durante 15 min a 4° C. Tras la centrifugación, se observan 3 fases distintas: la fase inferior o fase orgánica que contiene las proteínas, la fase intermedia donde se localiza el ADN y la fase superior o fase acuosa que contiene el ARN. Esta última se transfirió a un tubo nuevo, al que se le añadieron 1 µl de glucógeno y 500 µl de isopropanol para conseguir la precipitación del ARN. La mezcla se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y a continuación se le añadieron otros 0.2 ml de cloroformo. Tras una incubación de 2-3 min a temperatura ambiente, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 12,000 g a 4° C. El sobrenadante fue descartado y la pella se lavó con 1 ml de etanol al 75%, centrifugándose a continuación a 7,500 g durante 5 min a 4° C. Se retiró el etanol y se dejó secar el ARN a temperatura ambiente para resuspenderlo a continuación en un volumen apropiado (10-20 µl) de H₂O-DEPC en función del pellet obtenido. Para facilitar la resuspensión, el pellet de ARN se incubó durante 10 min a 60° C.

Para eliminar posibles trazas de ADN genómico, el ARN total extraído fue posteriormente tratado durante 30 min a 37° C con la enzima ADNasa I (Sigma-Aldrich, Madrid, España), utilizando 1 U de enzima por cada µg de ARN inicial. La concentración de ARN total obtenido se determinó por espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, EEUU) y su calidad se comprobó mediante la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm.

3.5.2. Retrotranscripción de ARN total.

La retrotranscripción del ARN tratado se realizó utilizando la transcriptasa reversa MMuLV (Fermentas; Ontario, Canadá) sobre una cantidad de ARN total de partida de 2 µg.

3.5.3. Diseño de oligonucleótidos.

Para el diseño de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se utilizó el programa Gene Runner V3.05 (Hasting Softwar, Inc) y el programa en red Primer3 (desarrollado por Steve Rozen y Helen Skaletsky y subvencionado por el Instituto Médico Howard Hughes y el Instituto Nacional de la Salud, EEUU).

Se eligieron oligonucleótidos altamente específicos para cada secuencia de interés, evitando los que pudieran amplificar otros genes de forma inespecífica así como los que presentaran otros sitios de unión inespecífica. También se descartaron los oligonucleótidos que pudieran formar estructuras secundarias muy estables tanto

consigo mismo como entre el par. Además, se seleccionaron oligonucleótidos cuya temperatura de alineamiento rondase los 60° C.

3.5.4. Clonación de DBNDD2 de rata.

La secuencia codificante de DBNDD2 se reamplificó a partir del cDNA obtenido de cerebro de rata mediante PCR utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad (Pwo Superyield DNA Polymerase, Roche Diagnostics, Madrid, España) y las parejas de oligonucleótidos específicos indicados en la Tabla 4. El fragmento amplificado (539 pb) fue clonado en el vector pMBL-T utilizando el kit pMBL-T vector, siguiendo las instrucciones del proveedor comercial (MBL, Córdoba, España). Este sistema permite la incorporación de adenina al extremo 3' del fragmento amplificado, lo que facilita la clonación T-A con el T-vector, que contiene timina en su extremo 3' lo que permite de aumentar la eficiencia de clonación.

La selección de los clones positivos se hizo mediante la transformación de bacterias competentes (ver apartado 3.4.9). Los plásmidos que contenían la secuencia de DBNDD2 se reamplificaron mediante PCR y parejas de oligonucleótidos conteniendo sitios de restricción específicos para su clonación en el vector phrGFP-N1 (Stratagene, Madrid, España), en el que la secuencia reportera (GFP) queda fusionada al extremo amino-terminal de la proteína a estudiar (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la clonación de la secuencia codificante del gen DBNDD2 murino en T-vector y phrGFP-N1.

Nombre	Secuencia (5'-3', <u>sitio de restricción</u>)	Vector generado
DBNDD2 rat up	5' GTGCGTGTCTTACTCCATTACCCC 3'	T-Vector
DBNDD2 rat low	5' GATCGCTCAGTTTGTAAAGGGCCT 3'	
DBNDD2 up (<i>HindIII</i>)	5' CTGAAGCTTGGATGGACCCAAATCCAC 3'	phrGFP-N1
DBNDD2 low (<i>BamHI</i>)	5' TAAAGGATCCCTAGCTGCAAGGTCCAGG 3'	

3.5.5. Clonación de la secuencia codificante del gen GDI2 humano en vectores eucariotas.

La secuencia codificante completa del gen GDI2 humano (número de acceso Genbank: NM-001494.2) clonada en el plásmido comercial pcMV6-XL5 se adquirió de la casa comercial Origene (Madrid, España). El cDNA correspondiente fue clonado en el vector pDsRed-Monomer-C1 (Clontech, Madrid, España) utilizando

una pareja de oligonucleótidos específicos de manera que la proteína fluorescente DsRed queda fusionada al extremo amino-terminal de la secuencia codificante de GDI2 (Tabla 5).

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la clonación de la secuencia codificante del gen GDI2 humano en el vector pDsRed-Monomer-C1.

Nombre	Secuencia (5'-3', <u>sitio de restricción</u>)	Vector generado
GDI2 up (<i>EcoRI</i>)	5' <u>AGAATTCA</u> ATGAATGAGGAGTACGACG 3'	pDsRed-Monomer-C1
GDI2 low (<i>BamHI</i>)	5' <u>AGGATCCT</u> TAGTCTTCCCATAGATGTC 3'	

3.5.6. Clonación de proteínas en vectores reporteros.

Ademas de las clonaciones citadas anteriormente se hizo anteriormente a nivel de nuestro laboratorio la clonacion de las proteinas de interes en vectores de expresion en celulas eucariotas para los diferentes experimentos realizados en este trabajo, y que se puede resumir en la Tabla 6.

Tabla 6. Vectores de expresión generados para los estudios realizados. *Se indica la posición en la que se localiza la proteína de interés con respecto al gen reportero.

Nombre	Tag y posición*	Vector	Experimento utilizados
DsRed-Rab18(Q67L)	DsRed (3')*	pDsRed-Monomer-C1 (Clontech, Madrid, España)	Video-microscopía
cMyc-Rab18	cMyc (3')*	pCMV-Myc (Clontech, Madrid, España)	Estudios bioquimicos
YFP-Rab18	YFP (3')*	pVenus-YFP (Clontech, Madrid, España)	Ensayos de interacción por FRET
CFP-HTT	CFP (3')*	pCFP (Clontech, Madrid, España)	Ensayos de interacción por FRET

3.5.7. Purificación de productos de PCR o de ADN plasmídico.

Tanto la purificación de los productos de PCR como de ADN plasmídico, de manera directa o a partir de geles de agarosa, se hizo utilizando el kit de la casa comercial Bioneer (Labotaq, Sevilla, España) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.5.8. Digestión enzimática y ligación.

Las digestiones con endonucleasas se realizaron con 2 U de la enzima correspondiente por cada μg de ADN durante 2 h a 37°C . En el caso de digestión no simultánea con dos enzimas, para evitar la recircularización del ADN digerido, entre cada digestión se hizo un tratamiento con $1\ \mu\text{l}$ de fosfatasa alcalina (Fermentas, Alemania) durante 15 min a temperatura ambiente, seguido de una desactivación de la enzima por choque térmico a 80°C durante 10 min. El ADN digerido se purificó utilizando el kit mencionado previamente.

Los fragmentos de ADN digeridos se fusionaron mediante ligación, empleando la T4 ligasa (Fermentas, Alemania) aplicando la siguiente relación molar:

$$2 \times \frac{\text{Tamaño del inserto (pb)}}{\text{Tamaño del vector}} = \frac{\text{Cantidad de inserto } (\mu\text{g})}{\text{Cantidad de vector } (\mu\text{g})}$$

La mezcla de ligación se incubó toda la noche a $8\text{-}12^\circ\text{C}$. Al día siguiente, se utilizaron $1\text{-}2\ \mu\text{l}$ de la mezcla de ligación ($20\ \text{ng}$) para la transformación de bacterias competentes.

3.5.9. Preparación y transformación de bacterias competentes.

La inducción de competencia de las bacterias se hizo utilizando los medios PSI-a ($5\ \text{g}$ de extracto de levadura, $20\ \text{g}$ de triptona, $5\ \text{g}$ de MgSO_4 , $14\ \text{g}$ de agar; se ajustó el pH a 7.6 con KOH), PSI-b (medio PSI-a sin agar), TFb-1 (acetato potásico $30\ \text{mM}$, KCl $100\ \text{mM}$, CaCl_2 $10\ \text{mM}$, y glicerol al 15% ; se ajustó el pH a 5.8 con ácido acético) y TFb-2 (MOPS $10\ \text{mM}$, CaCl_2 $75\ \text{mM}$, KCl $10\ \text{mM}$ y glicerol al 15%), utilizando la cepa *E.coli* *dh5a*.

Tras la selección de una colonia de las bacterias sembradas en placas de medio PSI-a, ésta se inoculó en $5\ \text{ml}$ de medio PSI-b, y se incubó toda la noche a 37°C en agitación. Se recogió $1\ \text{ml}$ de la suspensión y se inoculó en $100\ \text{ml}$ de PSI-b, incubándose hasta alcanzar una densidad óptica igual a 0.52 ± 0.3 a $550\ \text{nm}$, utilizando PSI-b como blanco. Una vez alcanzado este valor, la mezcla se enfrió y se centrifugó durante $5\ \text{min}$ a $3,000\ \text{g}$. El pellet se resuspendió en $40\ \text{ml}$ de TFb-1 y se centrifugó otra vez, y el pellet obtenido se resuspendió en $4\ \text{ml}$ de TFb-2 frío, que se

incubó en hielo durante 15 min. Finalmente, se prepararon alícuotas de 150 µl que se guardaron a -80° C.

Para la transformación de las bacterias competentes, las alícuotas se descongelaron a 4° C, y se permeabilizaron con solución de β-mercaptoetanol al 2% (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 10 min en un volumen 1/10 (v/v). A continuación, se incubaron 50 µl de esas bacterias con un volumen correspondiente a 20 ng de la mezcla de ligación. Pasados 30 min, las bacterias se sometieron a un choque térmico de 37° C durante 3 min y a un enfriamiento rápido en hielo (2 min), tras lo cual se añadieron 500 µl de medio LB sin antibiótico, incubándose la mezcla durante 30 min a 37° C en agitación. Tras este tiempo, se sembraron 200 µl de cada transformación en placas de LB con el antibiótico correspondiente, según el plásmido utilizado (kanamicina o ampicilina). Después de la incubación, se seleccionó una colonia de cada placa, que se sembró en 3 ml de medio LB con antibiótico, incubándose la mezcla toda la noche a 37° C en agitación. Posteriormente, se hizo la extracción de los plásmidos construidos utilizando el kit Favorgen (Biotech Corp. Zaragoza, España) siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial.

3.5.10. Secuenciación.

Todos los productos de PCR y las construcciones generadas por clonación en los diferentes vectores de expresión fueron secuenciados con los oligonucleótidos adecuados en el Servicio Centralizado de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba, empleándose el kit ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Branchburg, NJ, EEUU) y un secuenciador ABI PRISM™ 310 (Perkin Elmer, Applied Biosystems).

3.5.11. Análisis general de secuencias.

Los cromatogramas resultantes de las reacciones de secuenciación fueron analizados y editados con el programa BioEdit (Hall, 1999) y las secuencias derivadas de ellos fueron exportadas a formato FASTA y se compararon con la base de datos del NCBI utilizando las diferentes opciones de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

3.6. Ensayos de interacción proteína-proteína para la determinación de proteínas efectoras de Rab18.

Las interacciones proteína-proteína se dan en una gran variedad de procesos biológicos como la replicación, la transcripción, la secreción, la transducción de señales y el metabolismo. En este contexto, se han desarrollado una gran variedad de aproximaciones metodológicas para determinar la interacción entre dos o más proteínas, tanto *in vivo* como *in vitro*. En este trabajo se han utilizado cuatro tipos de ensayo para identificar las posibles proteínas, reguladoras o efectoras, que interaccionan con Rab18: *Fluorescence/Förster resonance energy transfer* (FRET) en células vivas o en células fijadas, co-inmunoprecipitación, cromatografía (FPLC), y ensayo de doble híbrido en levadura (*Yeast Two-Hybrid; Y2H*)

3.7. Metodología de Förster Resonance Energy Transfer (FRET).

3.7.1. Metodología de FRET en células fijadas.

Para la determinación de la posible existencia de interacción molecular de Rab18 con nuestras proteínas de interés, se empleó en una primera aproximación un ensayo de FRET (Fluorescent/ Förster Resonance Energy transfer) medido por microscopía de fluorescencia en células fijadas. Concretamente, se analizó la relación entre Rab18 [silvestre o la forma mutada Rab18(Q67L)] con la proteína kinesina (cadena ligera; KLC) y con la proteína huntingtina (HTT). Para ello, creamos vectores de expresión de Rab18 silvestre o Rab18(Q67L) acopladas a la proteína fluorescente Venus-YFP y de KLC o HTT acopladas a ECFP, que se utilizaron para realizar cotransfecciones de células PC12, siguiendo el protocolo convencional de transfección de este tipo celular. Tras 24 h, las células PC12 cotransfectadas con Rab18- o Rab18(Q67L)-Venus-YFP y las proteínas de interés, HTT- o KLC-ECFP, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y se visualizaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000 E (Nikon, Tokio, Japón), acoplado a una cámara Hamamatsu ORCA II BT (Hamamatsu City, Japón), controlado con el programa MetaMorph (Universal Imaging Corp., West Chester, PA, EEUU).

Se eligió la pareja de proteínas ECFP y Venus-YFP, que presentan una distancia o radio de Förster, R_0 (distancia a la que la transferencia de energía es del 50%), de 49 Å (Figura 8A), lo que permite la medida de la interacción de estas moléculas hasta una distancia de 100 Å. Adicionalmente, el espectro de emisión de la molécula

donadora (ECFP) tiene un solapamiento máximo con el espectro de excitación de la molécula aceptora (Venus-YFP) (Figura 8B).

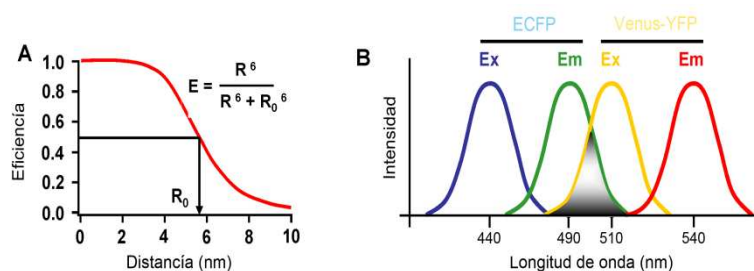


Figura 8. Dependencia de la distancia para la eficiencia de FRET y solapamiento espectral para la pareja de proteínas ECFP y Venus-YFP. (A) La transferencia de energía de resonancia (valores entre 0 y 1) es inversamente dependiente de la sexta potencia de la distancia que separa a ECFP y Venus-YFP (r). La distancia se presenta como múltiplo de la distancia de Förster o R_0 , siendo $R_0 = 49 \text{ \AA}$ para esta pareja de fluoróforos. (B) Los espectros de excitación (línea discontinua) y de emisión (línea continua) de ambos fluoróforos CFP (azul) y Venus-YFP (amarillo).

Las imágenes de FRET fueron corregidas con el método de “Fully Specified Bleed Through” (MetaMorph Universal Imaging Corp., West Chester, PA, EEUU) con el que se eliminan las contaminaciones que producen las señales de Venus-YFP y ECFP sobre el valor final de FRET, para lo que previamente hubo que calcular una serie de coeficientes utilizando células transfectadas, por una parte con Venus-YFP y, por otra parte, con ECFP (Figura 9).

La fórmula utilizada para el cálculo del FRET corregido fue:

$$\text{NFRET} = F - [A - (D_A * D)] * [A_F] - [D - (A_D * A)] * [D_F]$$

Donde F es la señal de FRET medido, A es la señal del aceptor (Venus-YFP) y D corresponde a la señal del donador (ECFP). Los coeficientes de corrección de la señal de FRET, A_D , A_F , A_D y D_F , corresponden a:

D_A = Intensidad de la imagen del aceptor con los filtros del donador dividida por la intensidad de la imagen del aceptor con los filtros del aceptor. Indica la proporción de señal del donador que contribuye a la señal del aceptor.

A_D = Intensidad de la imagen del donador con los filtros del aceptor dividida por la intensidad de la imagen del donador con los filtros del donador. Indica la proporción de señal del aceptor que contribuye a la señal del donador.

D_F = Intensidad de la imagen del donador con el juego de filtros de FRET dividida por la intensidad de la imagen del donador con el juego de filtros del donador. Indica la proporción de señal del donador que contribuye a la señal de FRET.

A_F = Intensidad de la imagen del aceptor con el juego de filtros de FRET dividida por la intensidad de la imagen del aceptor con el juego de filtros del aceptor. Indica la proporción de señal del aceptor que contribuye a la señal de FRET.

Empleando esta metodología, se evaluó la interacción de Rab18 con las moléculas del complejo motor, huntingtina (HTT) y la cadena ligera de la kinesina (KLC) en estado basal y tras un estímulo de 30 min con KCl. Estos experimentos se realizaron también con el mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L) en condiciones basales.

Con objeto de comprobar y validar las medidas obtenidas mediante esta técnica, se empleó un control negativo adicional consistente en la medida de FRET en células transfectadas con los vectores pECFP y pVenus-YFP vacíos, que permite medir la señal de FRET debida a la dimerización constitutiva de ambas proteínas fluorescentes. De la misma manera, se incluyó un control positivo, que consistió en la medida de FRET en células transfectadas con un vector que contenía las proteínas ECFP y Venus-YFP acopladas en fase, cedido por el Dr. RN Day, de la Universidad de Virginia (EEUU) y que proporcionaría el nivel máximo de señal de FRET (50%). Asimismo, se comprobó que todas las células evaluadas contenían cantidades similares de ECFP y Venus-YFP puesto que sus valores proporcionaban cocientes iguales o muy próximos a 1. Sobre la base de estas condiciones, se estudió la diferencia existente entre el valor de FRET de la pareja de receptores de interés en relación al control negativo, lo que fue considerado como interacción y, además, se refirieron todos los valores al control positivo, asignándosele a éste un valor del 50%, el cual refleja el valor máximo posible de FRET obtenido con nuestro sistema de medida para dichos valores de ECFP y Venus-YFP.

El análisis cuantitativo de las imágenes recogidas se llevó a cabo con el programa ImageJ 1.41. Los resultados obtenidos se procesaron utilizando el programa Microsoft Excel 2007.

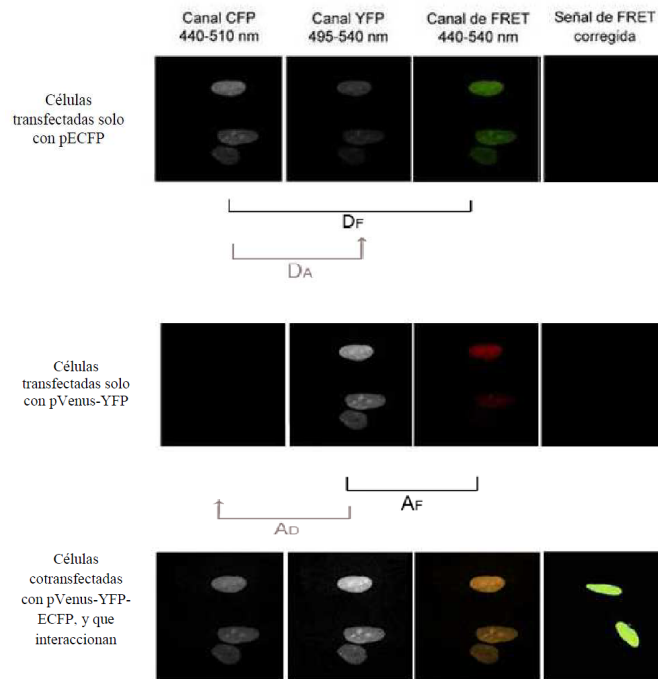


Figura 9. Resumen esquemático del cálculo de los coeficientes de corrección de FRET. El proceso comienza con la eliminación de las contaminaciones que producen las señales de ECFP y Venus-YFP sobre la señal de FRET, en que cada fila corresponde a imágenes de células transfectadas con pECFP, pVenus-YFP o cotransfectadas con ambas proteínas fluorescentes respectivamente. Cada columna corresponde a uno de los canales medidos, indicándose la longitud de onda de excitación y emisión de cada canal (CFP, Venus-YFP y FRET respectivamente). Los coeficientes D_A y D_F se calculan a partir de células transfectadas con pECFP y los coeficientes A_F y A_D se calculan a partir de células transfectadas con pVenus-YFP. La última fila corresponde a las imágenes de FRET corregidas con la formula indicada anteriormente. Las imágenes obtenidas y adaptadas de Terjung y Zimmermann (http://www.emblheidelberg.de/eamnet/html/teaching_modules.html).

3.7.1.2. Medidas de FRET a tiempo real.

Para realizar una cuantificación de la dinámica temporal de las interacciones entre Rab18 y las proteínas HTT y KLC se empleó una técnica de FRET que permite la medida de este parámetro en tiempo real en células individuales vivas. En concreto, los cambios rápidos de FRET se evaluaron en células PC12 cotransfectadas con Venus-YFP-Rab18 y con ECFP-HTT o ECFP-KLC. Así, se tomaron imágenes a longitudes de onda de excitación a 440 nm y emisión a 510 nm para ECFP, y a 495 nm de excitación y 540 nm de emisión para Venus-YFP. Los cambios de FRET se monitorizaron como el cociente entre la señal de Venus-YFP y ECFP normalizados y corregidos respecto al ruido de fondo para cada longitud de onda. Como nivel basal de referencia se tomó el nivel basal de FRET obtenido en los 80 s previos a la administración de un pulso despolarizante de K^+ .

3.8. Ensayos de co-inmunoprecipitación.

Para determinar otras proteínas que pudieran interactuar con Rab18, se empleó la técnica de inmunoprecipitación, que se basa en la capacidad de alguna clase de anticuerpos para formar complejos antígeno-anticuerpo cuando son añadidos a lisados celulares. Estos complejos se precipitan por reacción con proteína A o G unida a sefarosa. Una vez sedimentadas por centrifugación, los complejos se lavan y resuspenden para su análisis por SDS-PAGE.

Para llevar a cabo este experimento, se transfectó una placa de 10 cm de diámetro de células PC12 al 80% de confluencia, con el plásmido de expresión pCMV-myc-Rab18. Se utilizó además una placa control de células PC12 transfectadas con el vector vacío pCMV-myc bajo las mismas condiciones que las que recibieron el vector de expresión de Rab18. Tras 24 h de transfección, las placas se lavaron tres veces con PBS 1X y se recogieron en 1 ml de PBS 1X. A continuación, el extracto celular se centrifugó durante 5 min a 1,000 rpm y la pella resultante se resuspendió en 500 µl de tampón IP (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y Triton X-100 al 1%) conteniendo PMSF e inhibidores de proteasas. Las células se lisaron pasando la muestra 20 veces a través de una aguja 25-G en hielo y la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, guardándose el sobrenadante. Se recogieron entre 0.75-1 mg de proteínas, que se completaron hasta un volumen de 1 ml con el tampón IP con PMSF e inhibidores de proteasas. La muestra se trató con DNAsa durante 30 min a 4° C para eliminar posibles contaminaciones de ADN. Pasado este tiempo, se incubó el sobrenadante durante 1 h a 4° C con bolas (*beads*) de proteína A acoplada a sefarosa (Invitrogen), que fueron lavadas posteriormente 3 veces con el tampón IP sin PMSF y sin inhibidores de proteasas y centrifugadas a 1,000 rpm durante 1 min. Tras la incubación del extracto proteico con la proteína A acoplada a sefarosa, la muestra se centrifugó durante 1 min a 4° C para eliminar las bolas. Esta etapa de la inmunoprecipitación permite descartar todas las proteínas que puedan establecer uniones inespecíficas con la proteína A o con la sefarosa.

La muestra se incubó con 2 µg del anticuerpo anti-c-myc (AbD Serotec, Oxford, Reino Unido) toda la noche a 4° C en agitación orbital para permitir la unión de c-myc-Rab18 con el anticuerpo. Al día siguiente, el extracto proteico se incubó con 50 µl de bolas de proteína A acoplada a sefarosa previamente lavadas, y se dejó la mezcla en agitación durante 2 h a 4° C para permitir la adsorción de la proteína A al anticuerpo debido a la gran afinidad de esta proteína para el fragmento Fc de la

inmunoglobulina. Esto provoca la sedimentación de los complejos que contienen bolas de sefarosa-proteína A/anticuerpo c-myc-Rab18 y las posibles proteínas que interaccionan con Rab18 y que estarán unidas al complejo vía su unión a esta GTPasa.

Después de la incubación, la muestra se centrifugó a 1,000 rpm durante 1 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pella en 100 µl de tampón de carga Laemmli a una concentración 2 X. La mezcla se calentó durante 10 min a 95° C y se centrifugó a 1,000 rpm durante 1 min para disociar las bolas de sefarosa del complejo formado y para su análisis posterior por *Western blotting*.

Las proteínas separada por electroforesis fueron fijadas con una solución de metanol al 10% y acético al 7% (v/v) durante 30 min, y para la detección de las proteínas en el gel bidimensionale se usó la tinción comercial Sypro Ruby Protein Stains (Bio-Rad, Madrid, España) toda la noche en oscuridad y en agitación. Tras la incubación los geles se fijaron otra vez con la solución de metanol y acético 30 min y luego 3 lavados de 5 min con agua destilada.

Para analizar los geles se hicieron imágenes mediante un escaner especial capaz de detectar fluorescencia del Sypro Ruby (Molecular Imager™ Fx, Bio-Rad, Madrid, España). Después de analizar el gel, las proteínas existentes en la fracción de las muestras IP y no en la muestra control se cortaron y se mandaron al Servicio Central de Apoyo para la investigación de la universidad de Córdoba (SCAI) donde fueron purificadas y hidrolizadas por acción de proteasas específicas en pequeños péptidos cuyas masas fueron identificadas mediante espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Madrid, España). Las huellas peptídicas obtenidas se compararon con una base de datos biológica de proteínas cuya secuencia se conoce.

3.9. Estudios de cromatografía líquida (FPLC; *Fast Protein Liquid Chromatography*)

En este trabajo hemos puesto a punto un método de separación de las proteínas utilizando técnicas de cromatografía en columna por medio de FPLC usando el equipo ÄKTA Prime Plus de GE Healthcare Life Sciences (Barcelona, España). La purificación se llevó a cabo utilizando una columna de exclusión de proteínas de alto peso molecular, Superdex 200 10/300 GL (1 cm x 20 cm, volumen total = 20 ml) (GE Healthcare), que contiene una matriz de agarosa y de dextrano.

Para llevar a cabo estos experimentos, se transfectaron células PC12 sembradas en placas de 10 cm de diámetro con el vector pCMV-myc-Rab18 o con el vector vacío pCMV-myc (Clontech, Madrid, España). Tras 24 h de transfección, las células se lavaron 3 veces con el tampón PBS 1X, pH 7.4, se recogieron en 700 μ l de PBS 1X conteniendo PMSF e inhibidores de proteasas, y se centrifugaron a 1,000 rpm durante 5 min a 4° C. Posteriormente, las células se lisaron pasando la muestra 20 veces a través de una aguja 25-G en hielo. Los extractos celulares se centrifugaron a 14,000 rpm a temperatura ambiente para quitar todos los restos celulares y posteriormente se inyectaron en el columna del cromatógrafo.

Antes de proceder a la inyección de las muestras, la columna y el sistema fueron lavados con 50 ml metanol al 20%, seguido de un lavado con 50 ml de H₂O Milli-Q (Merck Millipore, Madrid, España), tras lo cual se equilibró la columna con el mismo tampón en el que se encuentra las muestras, PBS 1X. Se prestó especial atención a la limpieza del material y a la filtración de todas las soluciones antes de usarlas, y a evitar la formación de burbujas de aire durante la inyección que pudieran afectar a la lectura de la separación de las muestras.

Para cargar las muestras en la columna se utilizó PBS 1X, pH 7.4, aplicando una presión de 0.5 MPa con un flujo de 0.5 ml/min. Se cargaron 0.5 ml de la muestra control, correspondiente a células transfectadas con el vector vacío. Tras pasar por la columna, los componentes de la muestra pasaron por un lector de absorbencia a 280 nm. Las fracciones eluidas fueron recolectadas de manera automática en fracciones de 1 ml, obteniéndose un total de 15 fracciones. Tras el fraccionamiento de la muestra control, se limpió el sistema con agua Milli-Q y con PBS 1X, y se inyectó la muestra obtenida a partir de las células PC12 transfectadas con c-myc-Rab18.

Las proteínas presentes en las fracciones fueron precipitadas con acetona. Concretamente, cada fracción se mezcló con 4 ml de acetona fría y las mezclas se incubaron toda la noche a -20° C, tras lo cual se centrifugaron a 15,000 xg durante 15 min a 4° C. La pella se dejó secar y se resuspendió en 100 μ l de solución Tris-HCl 50 mM, pH 7.4.

Las fracciones se guardaron a -20° C hasta que se utilizaron para el estudio de inmunodetección de Rab18 en las mismas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, cargando 20 μ l de muestra con 5 μ l de tampón de carga al 5X. Las fracciones de interés se mandaron a la unidad de proteómica del SCAI para la identificación de las proteínas mediante un sistema de separación cromatográfica de

fase reversa en un nano-HPLC y posterior análisis con una Trampa de Iones con fuente de ionización de electrospray (Ultimate 3000, LCPackings- 4000 QTRAP, Applied Biosystems, Madrid, España).

3.10. Ensayos de doble híbrido en levaduras

Para evaluar la interacción de Rab18 con otras proteínas se utilizó el sistema de doble híbrido de levadura optimizado con el kit Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System (Clontech, Madrid, España). Este procedimiento consiste en acoplar la secuencia codificante de la proteína de interés, Rab18, a un factor de transcripción de dos dominios separables, el factor GAL4. Concretamente, Rab18 se fusionó al dominio de unión a ADN (DNA-DB) de GAL4, constituyendo el denominado *bait* (*cebo*). Por su parte, se utilizó una librería de cerebro de rata (Clontech, Madrid, España) que contiene las secuencias codificantes unidas al dominio de transactivación (AD) de GAL4, constituyendo las proteínas *prey* o *presa*. Cuando el *bait* de Rab18 interacciona con alguna de las proteínas *prey*, los dominios DNA-BD y AD se asocian y activan la transcripción de cuatro genes reporteros independientes (AUR1-C, ADE2, HIS3 y MEL1) (Figura 10).

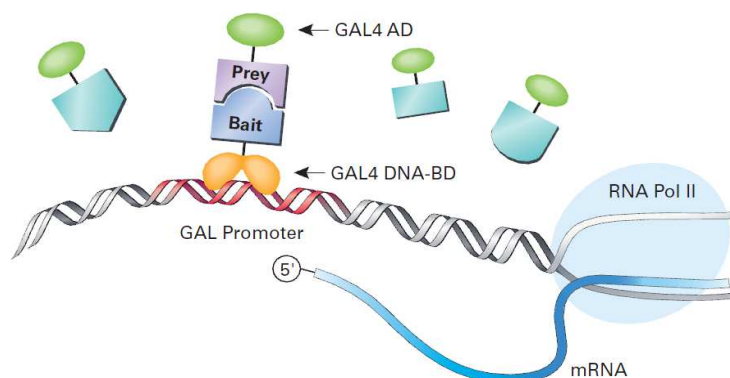


Figura 10. El principio del doble híbrido de levaduras. Dos proteínas se expresan por separado, la proteína *cebo* (*bait*) fusionada al dominio de unión a ADN de Gal4 (BD) y, la otra, la proteína *presa* (*prey*) fusionada al dominio de activación transcripcional de Gal4 (AD). En la cepa de levadura Y2H-Gold, la activación de los reporteros (AUR1-C, ADE2, HIS3 y MEL1) sólo se produce en las células que contengan proteínas que interactúan y se unen al promotor Gal4 (Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual, Clontech, Madrid, España).

3.10.1. Clonación de la secuencia codificante del gen Rab18 de ratón en el vector de expresión de levaduras.

Para aumentar la eficiencia de clonación, previo a la clonación en el vector de expresión de levaduras pGBKT7 (Clontech, Madrid, España), se llevó a cabo una clonación intermedia en el T-vector utilizando el kit pMBL-T vector (MBL, Madrid, España). Concretamente, este sistema inserta residuos de adenina al extremo 3' de los productos de PCR, lo que permite la clonación de éstos en el T-vector tras su digestión con EcoRV, ya que éste contiene timina en su extremo 3'.

La secuencia codificante del gen Rab18 murino fue reamplificada a partir del cDNA de Rab18 clonado en el T-vector, con cebadores específicos que llevaron los sitios de restricción EcoRI y BamHI, con el fin de que el dominio de activación GAL4 DNA-BD quedara fusionado al extremo amino terminal de Rab18. En la Tabla 7 se muestran los oligonucleótidos usados para la clonación de Rab18 en los vectores T-vector y pGBKT7.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la clonación de las secuencias codificantes del gen Rab18 murino en el T-vector y pGBKT7.

Nombre	Secuencia (5'-3', <u>sitio de restricción</u>)	Vector generado
YRC1101	5' AGGATGGACGAGGACGTG 3'	T-vector
YRC1102	5' GCAAAGTCAAGGTCCCTAA 3'	
YRC1107 (<u>EcoRI</u>)	5' GCAG <u>AATTC</u> ATGGACGAGGACGTGCTGA 3'	pGBKT7
YRC1109 (<u>BamHI</u>)	5' CGT <u>GGATCC</u> GGGTCTCAAATATCGTGCTCG 3'	

3.10.2. Clonación de la secuencia del mutante activo de Rab18 de ratón; Rab18(Q67L).

En un segundo ensayo de la técnica de Y2H, utilizamos la versión mutada de Rab18, Rab18-Q67L, que presenta una mutación en el sitio de unión a GTP que hace que la proteína esté constitutivamente activa puesto que no puede hidrolizar dicha molécula. La proteína mutante se obtuvo por mutagénesis dirigida, lo que se llevó a cabo usando el protocolo de PCR en dos etapas descrito por Ito *et al.* (Ito *et al.*, 2002).

La mutagénesis consistió en la sustitución de una leucina en posición 67 por una glutamina mediante mutaciones puntuales de un nucleótido del codón correspondiente utilizando un cebador específico (cebador III, Tabla 8). Además, se utilizó un

oligonucleótido específico en el que se introdujo un sitio de restricción silencioso [cebador *IV* (*BamHI*')] (sin alterar la secuencia codificante de la proteína).

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados para la generación del mutante activo Rab18(Q67L) y su clonación en el vector pGBKT7.

Nombre	Secuencia (5'-3', <u>sitio de restricción</u>)
<i>I</i> (<i>EcoRI</i>)	5' GCAG <u>AATTC</u> CATGGACGAGGACGTGCTGA 3'
<i>II</i>	5' TCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGG 3'
<i>III</i>	5' GATACAGCTGGTC <u>T</u> AGAGAGGTTTCAG 3'
<i>IV</i> (<i>BamHI</i>)	5' CGAC <u>AGA</u> <u>GCC</u> CCAGAGTTTATAGCACAGAG 3'

Los caracteres marcados en rojo indican la posición de la mutagénesis.

El protocolo de mutagénesis se realizó en dos etapas; la etapa de extensión y otra de solapamiento y extensión. La etapa de extensión comportó dos PCR diferentes en que dos tubos independientes, uno con el cebador *I* que lleva el sitio de clonación *EcoRI* y el cebador *IV* con un sitio de restricción *BamHI* mutado en tres nucleótidos para impedir su posterior digestión, y el otro con el cebador *II* y *III*. En ambos casos se utilizó como molde la secuencia de Rab18 de ratón clonada en el vector pGBKT7 con los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI* utilizando una ADN polimerasa de alta fidelidad (Pwo supeyield DNA polymerase, Roche diagnostics, EEUU) siguiendo las instrucciones del comercial (Figura 11)

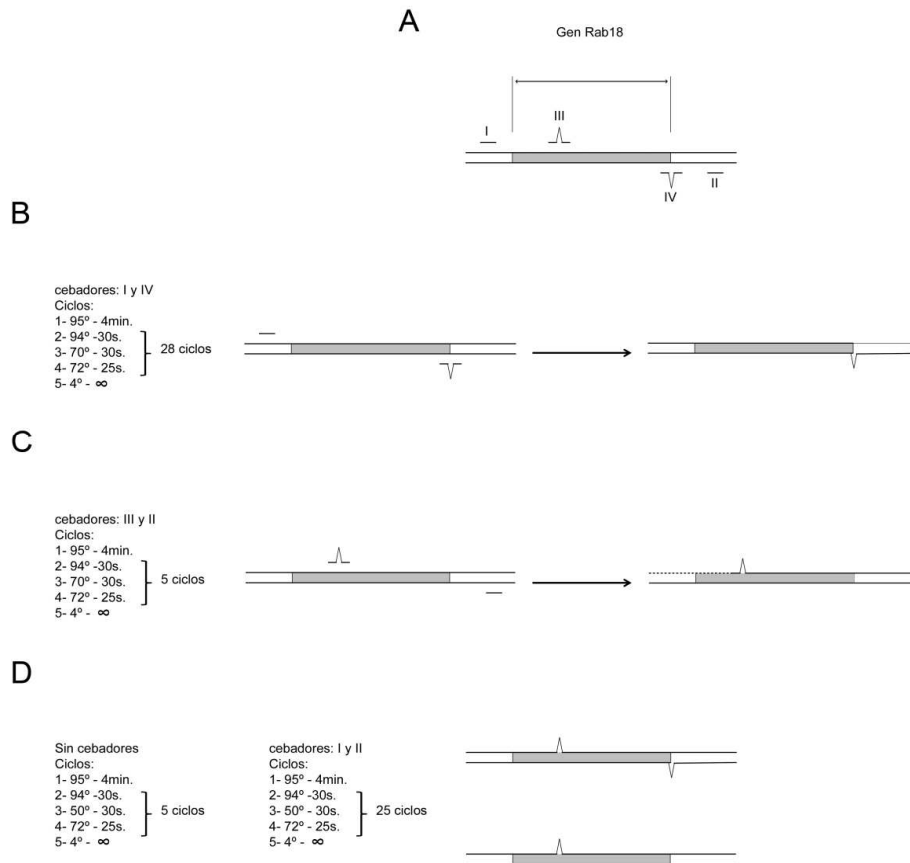


Figura 11: Resumen esquemático del proceso de mutagénesis dirigida realizado. Representación de las dos fases de mutagénesis dirigida para la generación de la versión mutada de Rab18, indicando (A) los diferentes oligonucleótidos utilizados, (B) la fase de extensión de la secuencia de Rab18 utilizando los oligonucleótidos **I** y **IV**, éste último portando el sitio de restricción silenciado BamHI, y (C) la segunda parte de la fase de extensión con el cebador **III**, que contiene la mutación puntual por la sustitución de una leucina en posición 67 por una glutamina, y el cebador **II**. La fase de solapamiento se realizó a temperatura de hibridación de 50° C, sin cebadores, durante 5 ciclos, seguida por una fase de extensión en la que se añadieron los oligonucleótidos **I** y **II**, lo que generó dos secuencias de Rab18: una que lleva una mutación en el sitio de unión a GTP y otra presentando una mutación adicional en el sitio de restricción BamHI.

La segunda etapa fue una PCR de solapamiento seguida por un PCR convencional, de manera que se mezclaron las resultantes de las reacciones de PCR de la primera etapa de la mutagénesis en un solo tubo para la PCR de solapamiento y de extensión, siguiendo el protocolo resumido en la Figura 11. Al final de la reacción se generaron dos secuencias diferentes, una que lleva una mutación en el sitio de unión a GTP y otra presentando una mutación adicional en el sitio de restricción BamHI.

La posterior selección de la secuencia de interés, que lleva la mutación solamente en el sitio de unión a GTP, se hizo por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI. A continuación, se realizó la ligación con el vector

pGBKT7 de manera que, al igual que la forma silvestre, el dominio de activación *GAL4* DNA-BD queda fusionada al extremo amino terminal de Rab18(Q67L). El plásmido recombinante generado se utilizó para la transformación de bacterias competentes, y la selección de los clones que llevaron la forma mutante de Rab18 crecieron en medio de selección con antibiótico.

3.10.3. Transformación de levaduras.

De igual forma que las bacterias, las levaduras pueden incorporar ADN exógeno mediante transformación. Para transformar las levaduras, hemos seguido el protocolo recomendado por la casa comercial (Clontech, Madrid, España), como se describe a continuación:

Se inoculó 1 ml de medio completo YPDA con dos o tres colonias de la cepa de levadura Y2HGold y la cepa Y187 conservada en glicerol a -80° C que ha sido posteriormente sembrada en placas de YPDA. Se dejaron crecer o/n a 30° C en agitación (250 rpm) y se transfirieron a un matraz de 250 ml de capacidad con 50 ml de YPDA y se incubaron 16-18h en agitación (250 rpm) hasta alcanzar la fase estacionaria ($OD_{600} > 1.5$) para poder transferirlas a 300 ml de medio YPDA y dejarla en agitación 6 h para llegar a una densidad óptica OD_{600} igual a 0.4-0.5. Las 2 cepas de levaduras se centrifugaron en tubos de 40 ml (Beckman) $1,000 \times g$ 5 min a temperatura ambiente y la pella resultante se resuspendió en 50 ml de agua estéril y se repitió la centrifugación y se descartó el sobrenadante y la pella celular se resuspendió en 1.5 ml de 1.1 x TE/LiAc recién preparado. Para cada transformación se utilizó 50 μ l de la suspensión de levaduras en tubos de 1.5 ml con 500 μ g de plásmido correspondiente con la precaución de preparar las mezclas de transformación en el orden puesto y la utilización de la solución de PEG/LiAc recién preparada.

En la Tabla 9 se describen las diferentes mezclas empleadas para obtener los controles de emparejamiento apropiados. Concretamente, se utilizaron los vectores pGBKT7-Rec, pGBKT7-53 y pGBKT7-Lam para transformar las cepas de levaduras correspondientes. También se utilizó un control de transformación y de activación (control TA) que consistente en la transformación de la cepa Y187 con el vector pGBKT7 vacío.

Las mezclas de transformación se agitaron por inversión y se incubaron a 30° C durante 30 min con agitación (200 rpm). Se les añadió a cada tubo 20 μ l de DMSO y se mezclaron por inversión con cuidado y se les dió un choque térmico a 42° C en

baño maría durante 15 min con agitación cada 5 min, y se pusieron en hielo 2-3min. Las levaduras fueron centrifugadas a 14,000 rpm 15 s, se les descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 1 ml de YPD Plus Liquid Medium para incubarlas a 30° C 90 min en agitación. Tras la incubación se centrifugó cada mezcla a alta velocidad 15 s, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió cada cepa en 1 ml de NaCl al 0.9% (m/v) y sembrar en las placas de 15 cm de diámetro correspondiente con 200 µl de la mezcla de transformación y se incubaron a 28-30° C durante 3–5 días.

Tabla 9. Mezclas de transformación de la cepa Y187 e Y2HGold con los vectores: Rab18, Rab18(Q67L), pGBKT7 y los vectores controles de emparejamiento.

Producto	Control TA	Rab18	Rab18 (Q67L)	Control #1	Control #2	Control #3
<i>SV40 large T PCR Fragment</i>	5	5	5	5	-	-
<i>pGBKT7</i>	500 µg	-	-	-	-	-
<i>pGBKT7-Rab18</i>	-	500 µg	-	-	-	-
<i>pGBKT7-Rab18(Q67L)</i>	-	-	500 µg	-	-	-
<i>pGBKT7-Rec</i>	-	-	-	500 µg	-	-
<i>pGBKT7-53</i>	-	-	-	-	500 µg	-
<i>pGBKT7-Lam</i>	-	-	-	-	-	500 µg
<i>Herring Tester arrier DNA denatured*</i>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<i>Cepa Y2HGold</i>	-	-	-	50	-	-
<i>Cepa 187</i>	50 µl	50 µl	50 µl	-	50 µl	50 µl
<i>PEG/LiAc</i>	500	500	500	500	500	500

* Previamente calentado dos veces a 100° C durante 5 min antes de poner en la mezcla de transformación.

Las levaduras transformadas con los vectores pGBKT7, Rab18 y Rab18(Q67L) se sembraron en las placas de agar con medio completo sin triptófano y con x-α-Gal (SD/-Trp/x-α-Gal), en placas sin los amino ácidos triptófano y adenina y con x-α-Gal (SD/-Ade/-Trp/x-α-Gal), y en placas carente de triptófano y de histidina y suplementadas con x-α-Gal. La cepa de levaduras Y2HGold que lleva el vector control #1 se sembró en placas con medio completo sin leucina, y los otros controles de emparejamiento; #2 y #3 se sembraron en placas SD/-Trp.

3.10.4. Control de toxicidad de Rab18 para las cepas Y187.

En el proceso de Y2H se deben hacer controles de toxicidad de la proteína de expresión. Así, se considera que la proteína *cebo* no es tóxica para las cepas Y187 si ésta crece en las placas SD/-Trp/x- α -Gal formando colonias azules con un diámetro 2-3 mm con una tasa de crecimiento igual o notablemente superior a las levaduras transformadas con el vector *mock*. Se puede verificar también la toxicidad de la proteína para las levaduras en cultivo líquido; si el crecimiento procede más despacio en comparación a las levaduras con el vector pGBKT7, posiblemente la construcción sea tóxica. En nuestro caso, ni la forma silvestre ni el mutante constitutivamente activo resultaron tóxicos para las cepas de levadura testadas.

Tras la comprobación de la no toxicidad de Rab18 para nuestra cepa de levadura transformada, fue necesario comprobar si esta activa a nivel transcripcional de manera que cuando la proteína *bait* no fue tóxica pero crecen colonias blancas en las placas SD/-His/-Trp/x- α -Gal y SD/-Ade/-Trp/x- α -Gal concluye que nuestra proteína está inactiva, y se consideró activa si las colonias son azules.

3.10.5. Control de la activación transcripcional de Rab18.

Cuando las proteínas *cebo* no son tóxicas pero crecen colonias blancas en las placas SD/-His/-Trp/x- α -Gal y SD/-Ade/-Trp/x- α -Gal, se concluye que nuestras proteínas están inactivas, mientras que se consideran activas si las colonias son azules.

Las colonias crecidas en SD/-Trp/x- α -gal que obtuvimos, azules y grandes (diámetro +/- 2mm), se picaron para hacer crecer en un matraz de 250 ml conteniendo 50 ml de medio líquido SD/-Trp/Kan. Tras 16-20 h de incubación en agitación a 30° C, hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ > 0.8, se centrifugaron a 600 x g durante 5 min. La pella se resuspendió en 5 ml de medio SD/-Trp y se procedió inmediatamente al emparejamiento de las cepas.

3.10.6. Analisis de la sobreexpresión de Rab18 en la cepa Y187.

Se comprobó la sobreexpresión de Rab18 y de su forma constitutivamente activa Rab18(Q67L) en las levaduras mediante el análisis del extracto proteico total de la cepa Y187 transformadas mediante western blot para detectar el inmunomarcado del epitopo c-myc que se acopló al lado amino de Rab18 al clonar en el vector pGBKT7. La obtención del extracto proteico total de las levaduras se obtuvo por extracción con

solución Urea/SDS, de manera que se picaron colonias azules de 2-3 mm de diámetros de las placas SD/-Trp/x- α -Gal y se sembraron en 5 ml de medio completo sin triptofano con kanamicina y se dejaron en agitación a 220-250 rpm toda la noche a 28-30° C, también se sembraron levaduras transformadas con el vector *mock* como control de nuestro análisis. Las levaduras crecidas se centrifugaron a 14,000 rpm 15 s en tubos de 1.5 ml y se resuspendieron en 1 ml de solución precalentada a 60° C de Urea/SDS (Urea 8 M, SDS 5% m/v, Tris-HCl pH 6.8 40 mM, EDTA 0.1 mM, azul bromofenol 0.4 mg/ml y β -mercaptoetanol 1%) suplementado con inhibidores de proteasas (PMSF 0.1 mM, quimostatina 5 μ g/ml, leupeptina 5 μ g/ml, antipaina 5 μ g/ml, pepstatina A 5 μ g/ml). Se les añadió a la solución de levaduras el equivalente en volumen de granos finos de arena de mar lavadas (Panreac, Barcelona, España) y se calentó la mezcla 10 min a 70° C y se agitó vigorosamente mediante vortex durante 1 min. El extracto de proteínas se recogió por centrifugación a 14,000 rpm 5 min y descartando la pella. Se utilizó 20 μ L de cada muestra para analizarlas mediante western blot (ver apartado 3.3) o se guardaron a -20° C hasta su procesamiento.

3.10.7. Emparejamiento de la cepa Y187 [pGBKT7-Rab18] con una librería de cDNA de cerebro.

Se adicionaron 5 ml de levaduras Y187 [pGBKT7-Rab18] en medio SD/-Trp en 45 ml de 2X YPDA en un matraz de 2 l de capacidad, a lo que se le añadió 1 ml de la librería comercial (630488 Mate & Plate™ Library - Mouse Brain, Clontech, Madrid, España). La mezcla se dejó unas 20 h en agitación muy suave (30-50 rpm) ya que una agitación superior podría afectar gravemente a la eficiencia del emparejamiento. Transcurrido este tiempo, se observa al microscopio (40x) si se encuentran estructuras trilobuladas (i.e., *schmoo*) y si es el caso, se continúa el emparejamiento durante 4 horas más. Si no se observan estas estructuras, el siguiente paso consiste en centrifugar la mezcla de emparejamiento a 1,000 rpm durante 10 min. Adicionalmente, se enjuaga la botella donde se esté llevando a cabo el emparejamiento dos veces con 50 ml cada vez de 0.5 X YPDA, se mezclan los dos lavados y se resuspende la pella en ellos.

Una vez que se observan las estructuras trilobuladas en la preparación, se espera hasta que el emparejamiento cumpla las 24 horas y después se centrifuga 10 min a 1,000 rpm. La pella se resuspende en 10 ml de agua estéril y filtrada y se siembran 200 μ l de la solución por placa, resultando por tanto unas 50 placas por

emparejamiento. Dichas placas son SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal (DDO/x- α -Gal) y lleva además aminotriazol (At) a una concentración de 10 μ M para restringir el crecimiento de colonias de falsos positivo del emparejamiento. Las placas se dejaron crecer al menos 5 días, ya que las colonias positivas tardan más en crecer, y se picaron las colonias azules resultantes. Estas se inocularon en una nueva placa con medio SD/-Ade/-His/-Leu/ X- α -Gal/At (QDO/x α -Gal/At) y se incubaron las placas a 30° C durante 2-4 días hasta el crecimiento de las colonias.

Para los controles, se picó una única colonia de unos 2-3 mm de cada tipo de las placas correspondientes, de manera que se sembró la colonia del control #1 en 5 ml de medio SD/-Leu y el control #2 y #3 se sembraron en 5 ml de medio SD/-Trp. Transcurido la incubación toda la noche en agitación a 250-280 rpm a 30°C, los controles se centrifugaron y se procedió al emparejamiento en tubos de 1.5 ml con 0.5 ml de medio 2X YPDA y se dejaron 20 h en agitación a 30-50 rpm a 30° C. el control positivo y negativo de emparejamiento se sembraron en las placas correspondientes (Tabla 10) y se dejaron 4-5 días de incubación a 30° C.

Tabla 10. Emparejamiento de los controles #1, #2 y #3.

Control	Cruzamiento	Placas de siembra	Fenotipo
Positivo	control #1 X control #2	-Leu/-Trp/X- α -Gal -Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal	Azul +
Negativo	control #1 X control #2	-Leu/-Trp/X- α -Gal -Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -Gal	Sin colonias +

3.10.8. Screening de las colonias positivas por PCR.

Después de asegurarse del buen procedimiento del emparejamiento con el control negativo y positivo del emparejamiento, las colonias del emparejamiento de Rab18 y Rab18(Q67L) con la librería de ratón con el fenotipo esperado (color azul y con diámetro de 2-3 mm) se aislaron sembrando en placas QDA con X- α -Gal y Aureobasidin A y se incubaron 4-5 días a 30° C.

El screening de la colonias positiva se hizo mediante PCR utilizando el kit comercial Matchmaker™ Insert Check PCR Mix 2 (Clontech, Madrid, España) que lleva los cebadores específicos que permiten la amplificación de los genes de la librería de ratón clonada en el vector pGADT7-RecAB. Para el chequeo se cogió una fracción de cada colonia y se diluyó en 25 μ l de agua estéril y se mezcló con 25 μ l del

kit de PCR, también se puso un control negativo de PCR que consistía en poner agua estéril sin levaduras. Se utilizó para la amplificación; un ciclo de 1 min a 94° C y 30 ciclos de 10 s a 98° C y 3 min a 68° C. Tras la amplificación se analizaron los fragmentos de ADN amplificados por electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidium y la secuencias separadas se purificaron y se mandaron a secuenciar al servicio central de apoyo para la investigación para la identificación de las secuencias nucleotídicas de las proteínas que interaccionaron con Rab18 utilizando el cebador T7 y el cebador 3' AD (5'AGAGGTGCACGATGACAG 3').

3.11. Análisis estadístico.

Los valores que se muestran en las figuras representan la media \pm SEM (error estándar de la media) de los resultados obtenidos a partir de al menos tres experimentos independientes realizados sobre cultivos celulares separados. En los estudios en los que se compararon únicamente dos grupos experimentales, se utilizó una prueba *t*-Student. En estudios con más de dos grupos experimentales, el análisis estadístico se realizó empleando un análisis de varianza de una vía (“one way ANOVA”) seguido de la prueba de comparación de rangos múltiples de Newman-Keuls. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EEUU). Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas a partir de un nivel de confianza superior al 95% ($P < 0,05$).

4.- RESULTADOS

4.1.- Rab18 modifica la dinámica de movimiento de los gránulos de secreción en respuesta a estímulos extracelulares

La video-microscopía en tiempo real sobre células vivas nos permitió realizar un análisis detallado del movimiento de las vesículas, lo que reveló la existencia de diferencias importantes en los patrones de transporte que siguen los gránulos de secreción según tengan o no Rab18 asociado a su superficie. Concretamente, monitorizamos células PC12 transfectadas con un vector de expresión que codifica para la proteína de secreción NPY fusionada a GFP, antes y después de la administración de un pulso despolarizante de K^+ , prestando especial atención a la evolución de varios parámetros de transporte clave de los gránulos (*i.e.* trayectoria y velocidad) en respuesta a la estimulación del proceso secretor. En la Figura 12A, así como en el Video 1 incluido en la Información Suplementaria, se muestra un ejemplo representativo del movimiento de los gránulos de secreción que contienen NPY-GFP, subrayando las diferentes trayectorias que siguen dichos gránulos gracias al uso de un software diseñado específicamente para el análisis del movimiento de partículas fluorescentes (DIATRACK; Semasopht, North Epping, Australia). En concreto, este tipo de análisis mostró que, bajo condiciones basales, la mayoría de los gránulos con NPY-GFP presentaban movimientos saltatorios pero confinados a un espacio celular reducido. En lo referente a las trayectorias netas, el 53% de los gránulos presentaron movimientos dirigidos hacia el núcleo celular (movimiento retrógrado), mientras que el 47% restante siguieron trayectorias anterógradas, moviéndose hacia la membrana plasmática. La longitud media recorrida por los gránulos tanto con movimiento anterógrado como retrógrado fue de $2.00 \pm 0.32 \mu\text{m}$, la velocidad media de $0.16 \pm 0.03 \mu\text{m/s}$, y el coeficiente de difusión de $2.47 \pm 0.76 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$. En mayor o menor medida, todos estos parámetros se vieron afectados tras la despolarización celular inducida por K^+ . En particular, la exposición de las células a una solución con una elevada concentración de K^+ (*i.e.* 53 mM), produjo un aumento significativo del número de gránulos dirigidos hacia la membrana plasmática con movimiento anterógrado (64%) y una reducción paralela del porcentaje de gránulos con trayectoria retrógrada (36%). Además, la distancia recorrida, la velocidad y el coeficiente de difusión de los gránulos positivos para NPY-GFP aumentaron de manera significativa tras la estimulación del proceso secretor ($4.00 \pm 0.74 \mu\text{m}$, $0.25 \pm 0.04 \mu\text{m/s}$, y $4.44 \pm 1.47 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, respectivamente). En la Figura 12B se presentan las comparaciones

gráficas de estos parámetros en células PC12 transfectadas con NPY-GFP y monitorizadas bajo condiciones basales y tras la estimulación con K^+ . En la Figura 12C se muestra un ejemplo representativo de la trayectoria y velocidad a lo largo del tiempo de un gránulo con NPY-GFP antes y después de la estimulación de la ruta secretora. Como se observa en este último panel, este gránulo, al igual que la mayoría de los gránulos analizados (74%), aumenta notablemente su velocidad inmediatamente después de la administración de K^+ . Curiosamente, una población de gránulos que contienen NPY-GFP (26% de los gránulos analizados) presentaron dinámicas de movilización opuestas a las exhibidas por la mayoría en respuesta al estímulo despolarizante, es decir, sus velocidades medias resultaron significativamente disminuidas tras el tratamiento con K^+ (0.16 ± 0.03 vs. 0.08 ± 0.01 $\mu\text{m/s}$ antes y después de la administración de K^+ , respectivamente).

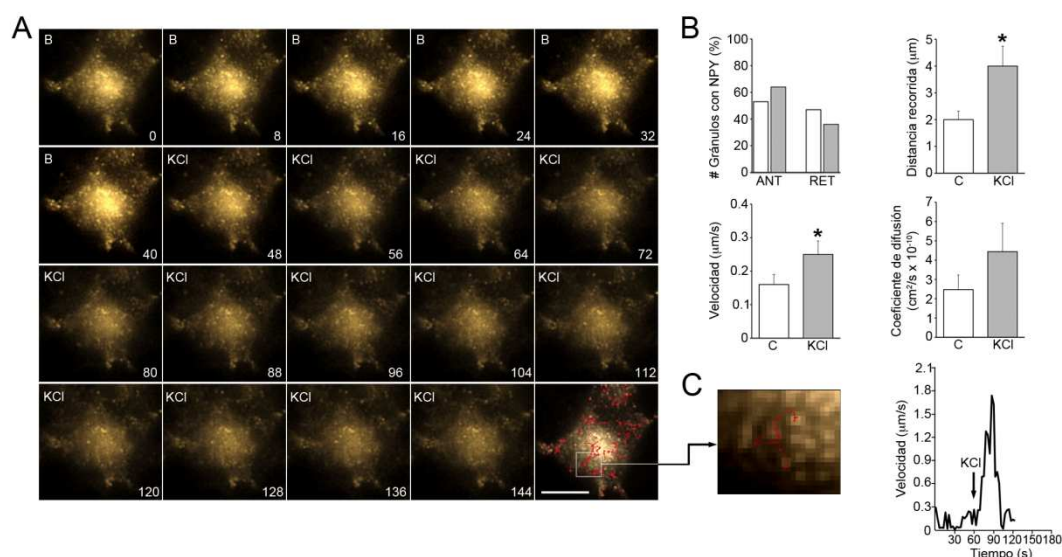


Figura 12: Imágenes y cuantificación de los resultados obtenidos mediante video-microscopía en tiempo real en células transfectadas con NPY-GFP y monitorizadas bajo condiciones basales y tras la estimulación con K^+ . (A) Ejemplo representativo del movimiento de los gránulos de secreción que contienen NPY-GFP, subrayando las diferentes trayectorias que siguen dichos gránulos. Barra de escala, 5 μm . (B) Comparación entre los diferentes parámetros del experimento. Bajo condiciones basales, el 53% de los gránulos con NPY-GFP en su interior presentaron un movimiento retrógrado, mientras que el 47% restante siguieron una trayectoria anterógrada. La estimulación de las células con K^+ produjo un aumento significativo del número de gránulos con movimiento anterógrado (64%) y una reducción paralela del porcentaje de gránulos con trayectoria retrógrada (36%). Además, la distancia recorrida, la velocidad y el coeficiente de difusión de los gránulos positivos para NPY-GFP aumentaron de manera significativa tras la estimulación con K^+ . (C) Ejemplo representativo del movimiento de un gránulo con NPY-GFP antes y después del tratamiento con K^+ . *, $P < 0.05$ vs. control.

Por otra parte, en células PC12 transfectadas con el mutante constitutivamente activo de Rab18 [*i.e.* Rab18(Q67L)] unido a la proteína fluorescente DsRed, los gránulos de secreción marcados con la GTPasa también mostraron movimientos

saltatorios, confinados a un dominio específico del citosol y aparentemente aleatorios (Figura 13A y Video 2 de la Información Suplementaria). Al igual que los gránulos que contienen NPY, el 53% de los gránulos de secreción positivos para el mutante activo de Rab18 presentaron un tipo de movimiento retrógrado bajo condiciones basales, mientras que el 47% restante se movieron en dirección anterógrada. En estas condiciones, los gránulos recorrieron distancias medias ($2.54 \pm 0.29 \mu\text{m}$) y presentaron coeficientes de difusión ($2.22 \pm 0.58 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$) similares a los gránulos positivos para NPY-GFP. Sin embargo, los gránulos con DsRed-Rab18(Q67L) mostraron velocidades a lo largo de las trayectorias ($0.12 \pm 0.02 \mu\text{m}/\text{s}$) ligeramente disminuidas comparadas a las observadas para los gránulos con NPY-GFP, aunque dichos valores no resultaron significativamente diferentes. No obstante, las diferencias más destacadas se observaron en relación al efecto de la activación de la ruta secretora sobre la dinámica de movilización de gránulos enriquecidos en Rab18 en comparación con la inducida sobre gránulos con NPY y que, aparentemente, no contienen o presentan menor cantidad de Rab18 (*i.e.*, la posible Rab18 expresada de manera endógena). Al contrario de lo observado para estos últimos, el porcentaje de gránulos con Rab18 que presentaron movimientos netos retrógrados aumentó tras la estimulación de la secreción, mientras que el número de gránulos con movimiento anterógrado disminuyó de forma paralela (61% y 39%, respectivamente). La distancia recorrida por los gránulos no varió tras la administración de K^+ ($2.33 \pm 0.45 \mu\text{m}$; Figura 13B), pero tanto la velocidad a lo largo de las trayectorias como el coeficiente de difusión se vieron reducidos significativamente con respecto a lo observado en condiciones basales ($0.05 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{s}$ y $1.14 \pm 0.42 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, respectivamente; Figura 13B). En la Figura 13C se muestra un ejemplo representativo del patrón de movimiento de un gránulo positivo para DsRed-Rab18(Q67L) antes y después del tratamiento con K^+ . Finalmente, y al contrario de lo observado para la población de gránulos con NPY, que clasificamos en dos grupos dependiendo de si la velocidad a lo largo de la trayectoria aumentaba o disminuía en respuesta al estímulo secretor, los gránulos con Rab18 en su superficie presentaron un comportamiento homogéneo. Así, aunque en diferente medida, todos los gránulos con Rab18 sufrieron una reducción en su velocidad tras la administración de K^+ .

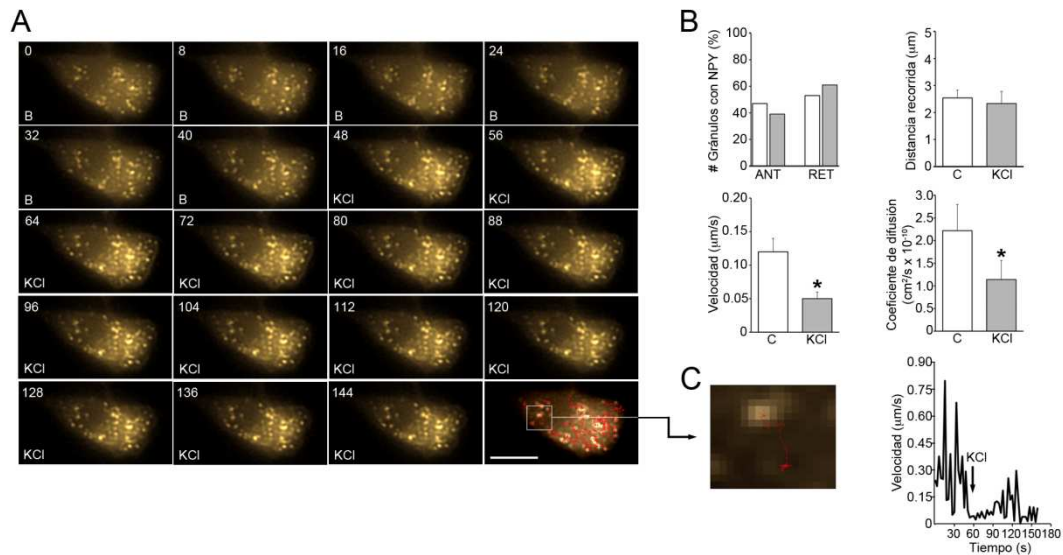


Figura 13: Imágenes y cuantificación de los resultados obtenidos mediante video-microscopía en tiempo real en células transfectadas con DsRed-Rab18(Q67L) y monitorizadas en condiciones basales y tras la estimulación con K^+ . (A) Ejemplo representativo del movimiento de los gránulos de secreción que contienen DsRed-Rab18(Q67L). (B) Representación gráfica de los diferentes parámetros analizados. En condiciones basales, el 53% de los gránulos con DsRed-Rab18(Q67L) presentaban movimiento retrógrado, mientras que el 47% restante siguieron trayectorias anterógradas. La estimulación de las células con K^+ produjo un aumento significativo del número de gránulos con movimiento retrógrado (61%) y una reducción paralela del porcentaje de gránulos con trayectoria anterógrada (39%). La distancia recorrida por los gránulos no se modificó tras la administración de K^+ , pero la velocidad y el coeficiente de difusión de los gránulos que presentaban DsRed-Rab18(Q67L) se vieron reducidos de manera significativa. (C) Ejemplo representativo del patrón de movimiento de un gránulo positivo para DsRed-Rab18(Q67L) antes y después del tratamiento con K^+ . Barra de escala, 5 μm . *, $P < 0.001$ vs. control.

4.2.- La movilidad de los gránulos de secreción que presentan Rab18 depende de la red de citoesqueleto de microtúbulos

A continuación, analizamos la relación espacial de los gránulos de secreción que presentan Rab18 en su superficie con el citoesqueleto celular. En primer lugar, usamos faloidina-Alexa488 para marcar fluorescentemente la red del citoesqueleto de actina en células PC12 transfectadas con el mutante constitutivamente activo DsRed-Rab18(Q67L) y visualizamos ambos marcadores mediante microscopía confocal. En la Figura 14A se muestra un ejemplo representativo de la distribución de los filamentos de actina y la posición relativa de los gránulos con Rab18 con respecto a estos elementos del citoesqueleto. Como se puede observar, los filamentos de actina abundan predominantemente en la periferia celular cerca de la membrana plasmática, formando el córtex celular, y se acumulan en las proyecciones citoplasmáticas típicas de células PC12 (*puncta*). Por su parte, el mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L) adquiere una distribución punteada por todo el citosol que, como se

puede observar en el gráfico de correlación (Figura 14B), no coincide espacialmente con la red de actina.

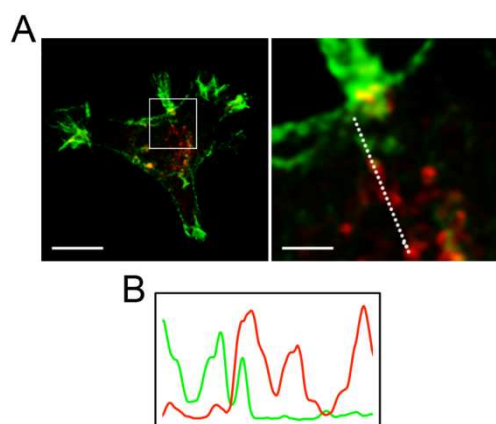


Figura 14: Análisis de la relación espacial entre los gránulos positivos para Rab18 y los filamentos de actina. (A) Imagen de microscopía confocal representativa de una célula PC12 transfectedada con el mutante activo DsRed-Rab18(Q67L) (rojo) y marcada con faloidina-Alexa488 (verde). Barras de escala, 5 µm (izquierda) y 2 µm (derecha). (B) Gráfico de la distribución de las señales fluorescentes a lo largo de la línea punteada en (A). Como se puede observar, DsRed-Rab18(Q67L) no coincide espacialmente con la red de actina.

Teniendo en cuenta la ausencia de colocalización de los gránulos Rab18-positivos con el citoesqueleto de actina y la posición relativa que ocupan estos gránulos, situados a cierta distancia de la membrana plasmática, consideramos la posibilidad de que su movimiento pudiera estar mediado por la red de microtúbulos. Este razonamiento fue comprobado en células PC12 transfectedadas con el mutante constitutivamente activo DsRed-Rab18(Q67L), en las que monitorizamos la localización subcelular de la GTPasa en relación con la red de microtúbulos, que fueron visualizados gracias al marcaje de las células con tubulina fluorescente. En la Figura 15A y en el inserto ampliado se muestra un ejemplo representativo de una célula PC12 que expresa DsRed-Rab18(Q67L) y que, antes de su fijación, fue expuesta a *Tubulin-Oregon Green*. Como se muestra en la imagen, los gránulos marcados con Rab18 presentan una distribución próxima a la red de microtúbulos, lo que sugiere la existencia de una relación física entre estas dos estructuras celulares. El análisis de las intensidades de fluorescencia de ambos canales pixel por pixel (gráfica de correlación) confirmó esta observación. En la mayoría de los casos, la señal procedente de DsRed-Rab18(Q67L) coincide espacialmente con la de *Tubulin-Oregon Green* (Figura 15B).

Por otra parte, también se analizó la dinámica de movilización de los gránulos con Rab18 en relación a la red de microtúbulos mediante video-microscopía confocal en células vivas. En la Figura 16A, así como en el Video 3 incluido en la Información

Figura 15: Análisis de la relación espacial entre los gránulos positivos para Rab18 y la red de microtúbulos. (A)

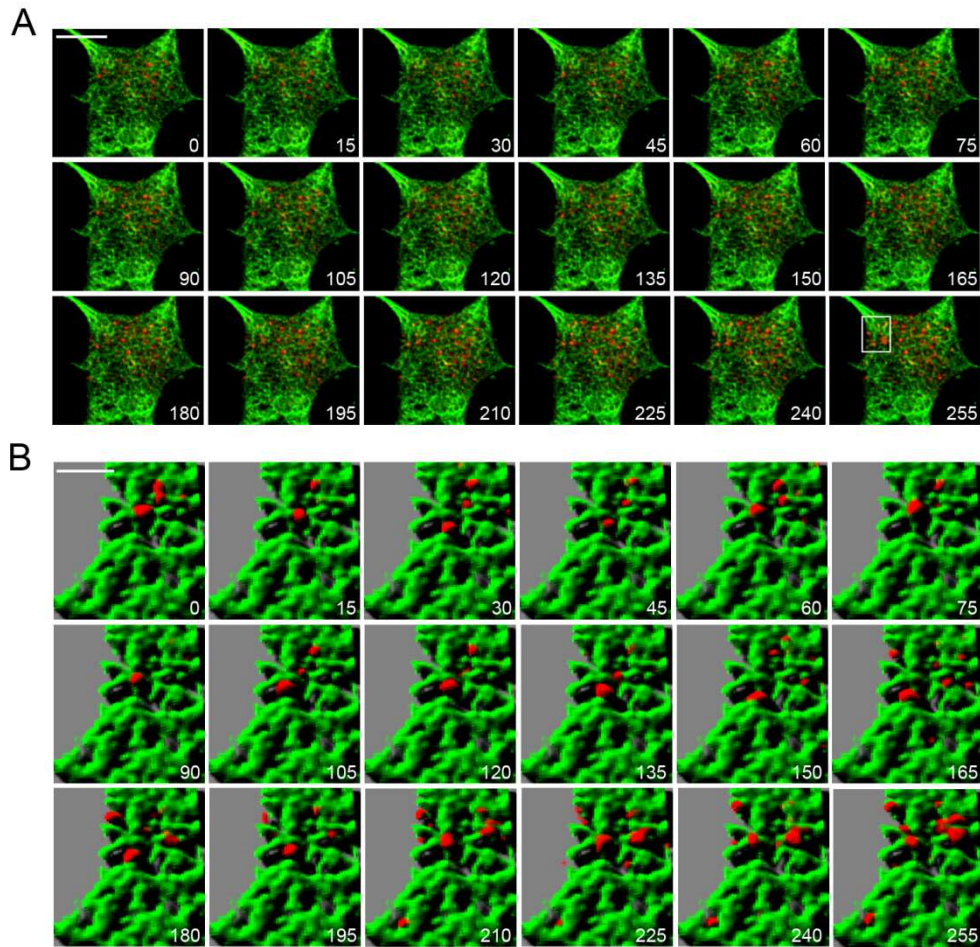


Figura 16: Movimiento de los gránulos con Rab18 en relación a la red de microtúbulos. (A) Video-microscopía confocal en una célula PC12 viva representativa transfectada con DsRed-Rab18(Q67L) y cargada con *Tubulin Oregon-Green*. Como se puede observar, los gránulos con Rab18 en su superficie alternan movimientos retrógrados y anterógrados confinados en zonas próximas a haces de microtúbulos. Barra de escala, 5 μm . (B) Región de interés de la célula mostrada en el panel superior, ampliada y renderizada. Barra de escala, 1 μm .

cuantificación del número de gránulos positivos para GFP-Rab18(Q67L) por unidad de superficie celular evidenció que, mientras que la versión silvestre de Rab18 en células tratadas con K^+ o el mutante activo en células no tratadas se acumulaban en estructuras punteadas, el tratamiento con nocodazol indujo una disminución del 80% en el número de gránulos positivos para la GTPasa [0.84 ± 0.09 vs. 0.14 ± 0.02 gránulos con Rab18(Q67L)/ μm^2 en ausencia y presencia de nocodazol, respectivamente] (Figura 17B). Estos datos indican que el reclutamiento de Rab18 a la superficie de los gránulos de secreción requiere la existencia de una red íntegra de microtúbulos.

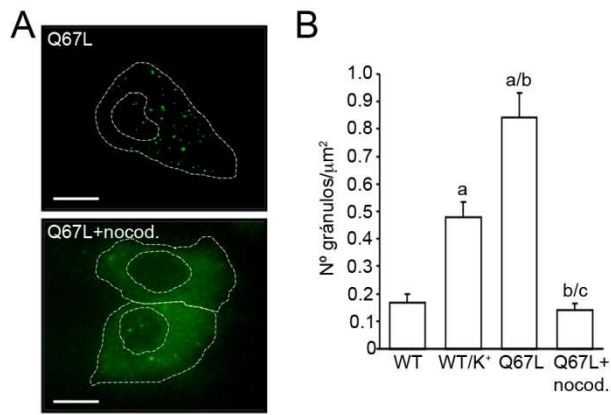


Figura 17: La despolimerización de la red de microtúbulos impide la asociación de Rab18 con los gránulos de secreción. Células transfectadas con GFP-Rab18(Q67L) fueron tratadas con nocodazol 10 μM durante 1 h y el número de gránulos positivos para Rab18 fue cuantificado con la ayuda del software ImageJ. (A) Micrografías representativas de células que expresan GFP-Rab18(Q67L) en condiciones basales (panel superior) y tras el tratamiento con nocodazol (panel inferior). En ausencia de nocodazol, GFP-Rab18(Q67L) se

distribuye mayoritariamente en estructuras punteadas que corresponden con gránulos de secreción. Tras la despolimerización de la red de microtúbulos, el mutante activo presenta una distribución difusa en el citosol. Barras de escala, 5 μm . (B) Cuantificación del número de gránulos de secreción positivos para Rab18 en células transfectadas con la forma silvestre de Rab18 (WT) o el mutante constitutivamente activo [Rab18(Q67L)]. Tal como se muestra en la gráfica, el número de gránulos positivos para Rab18, que aumentó tras la despolarización con K^+ de células transfectadas con Rab18WT o en células no estimuladas y transfectadas con el mutante constitutivamente activo [Rab18(Q67L)], disminuyó considerablemente después del tratamiento de las células con nocodazol. a, $P < 0.05$ vs. WT; b, $P < 0.05$ vs. WT/K⁺; c, $P < 0.05$ vs. Q67L).

4.3.- Rab18 interacciona con la proteína motora quinesina-1 y con huntingtina

Las proteínas Rab interactúan con efectores específicos de manera secuencial para facilitar el transporte vesicular en cada una de las distintas fases de dicho proceso, desde la formación del gránulo a partir del compartimento de origen del cargo hasta la fusión con la membrana diana (Schwartz *et al.*, 2007). Se ha demostrado que un número importante de proteínas Rab (*e.g.* Rab6, Rab7, Rab11 y Rab27) controlan pasos concretos de este proceso gracias al reclutamiento de proteínas motoras de asociación a filamentos de actina o a microtúbulos que mueven el *cargo* a lo largo de los haces del citoesqueleto (Jordens *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta nuestros resultados respecto a la relación espacial de los gránulos que presentan Rab18 en su superficie y los haces de microtúbulos, se investigó a continuación si Rab18 podría interactuar con componentes específicos de la maquinaria molecular responsable del transporte de gránulos de secreción a lo largo de microtúbulos. Para ello, analizamos la posible asociación de Rab18 con componentes importantes de esta maquinaria, el complejo motor dinactina, quinesina y huntingtina (HTT). En primer lugar, evaluamos la relación espacial de Rab18 con estas proteínas usando para ello doble inmunocitoquímica o transfección, simple o doble, con vectores reporteros seguido de microscopía confocal.

En primer lugar, analizamos la relación espacial de Rab18 y un componente del complejo motor dinactina, la proteína p150^{Glued}, que es requerido para mantener la

procesividad de la proteína motora dineína y, por tanto, regula el movimiento centrípeto de cargos dependiente de microtúbulos (Schroer, 2004). Para ello, llevamos a cabo transfecciones transitorias con un vector de expresión que codifica para c-myc-p150^{Glued} (cedido amablemente por la Dra. Erika Holzbaur, Universidad de Pensilvania) y, tras 24 h, se trataron las células con KCl 53 mM y se realizó una doble inmunofluorescencia contra c-myc y Rab18. En la Figura 18 se muestra una imagen representativa de una célula PC12 que expresa c-myc-p150^{Glued} (rojo) e inmunoteñida para Rab18 (verde). Como se puede observar en la imagen combinada y en la ampliación de una región de interés, tras la administración de K⁺, Rab18 se encuentra en estructuras vesiculares que, en muchas ocasiones, coinciden espacialmente con las positivas para c-myc-p150^{Glued} (índice de colocalización Mander's 0.29 ± 0.033 ; n = 24 células).

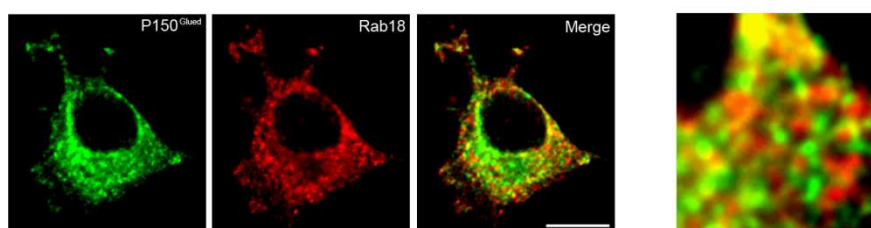


Figura 18: Colocalización de c-myc-p150^{Glued} con gránulos positivos para Rab18. Imágenes representativas de microscopía confocal de una célula PC12 transfectada con c-myc-p150^{Glued} (rojo) e inmunoteñida para Rab18 (verde), donde se observa un cierto grado de colocalización de ambas señales fluorescentes en estructuras vesiculares. Barra de escala, 5 μ m.

Igualmente, analizamos la relación espacial de Rab18 con el motor molecular quinesina-1, que media el movimiento anterógrado de *cargo*. Para este análisis, utilizamos en primer lugar células PC12 transfectadas con un vector que codifica para la subunidad ligera de la proteína (KLC) unida al marcador fluorescente CFP (donado por la Dra. Kristen Verhey, Universidad de Michigan), que es la encargada de seleccionar y unirse a *cargos* específicos (Bowman *et al.*, 2000; Verhey *et al.*, 2001). Concretamente, el vector codifica la KLC unida al marcador fluorescente CFP, por lo que las células transfectadas se inmunotñieron con un fluorocromo rojo (Alexa594) para detectar Rab18 endógena. Estos estudios mostraron que, al igual que en los casos anteriores, Rab18 localiza de manera difusa ocupando todo el citosol y raramente colocaliza con estructuras positivas para KLC (Figura 19A, panel izquierdo). Sin embargo, cuando se estimula la actividad secretora de las células, Rab18 se asocia a vesículas que, en numerosas ocasiones, presentan también en su superficie KLC

(Figura 19A, panel derecho). Este aumento en el grado de colocalización se puede apreciar mejor en la representación gráfica del valor medio del índice de colocalización de Rab18 y KLC en células control ($n = 17$) y células estimuladas con KCl ($n = 17$) (Figura 19B), donde se muestra un aumento del 43% de la colocalización de ambas proteínas tras el tratamiento.

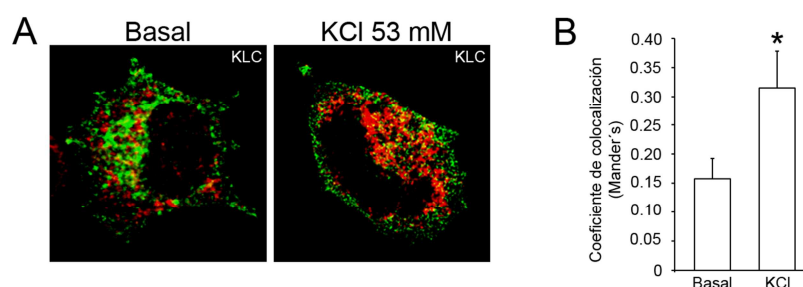


Figura 19: Colocalización de Rab18 con la subunidad ligera de la quinesina-1 KLC. (A) Imágenes representativas de células PC12 transfectadas con KLC-CFP (verde) e inmunoteñidas para Rab18 (rojo) en las que se observa el aumento de colocalización de ambas señales tras el estímulo con KCl. Barras de escala, 5 μm . (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes antes y después de la administración de K^+ . *, $P < 0.05$ vs. Basal.

También analizamos la relación de Rab18 con quinesina-1 mediante análisis de colocalización utilizando esta vez la subunidad pesada de la proteína motora (KIF5C) unida a GFP (obtenida gracias a la generosidad de la Dra. Michelle Peckham, Universidad de Leeds, Reino Unido). Al igual que ocurrió con KLC, el grado de solapamiento de ambas señales fue bajo en células no tratadas (Figura 20A, panel izquierdo), mientras que se pudieron observar numerosos gránulos positivos para ambas proteínas en células tratadas con KCl (Figura 20A, panel derecho). En la Figura 20B se presentan los valores medios del índice de colocalización de Rab18 y KIF5C, donde se puede observar que el grado de solapamiento de estas proteínas

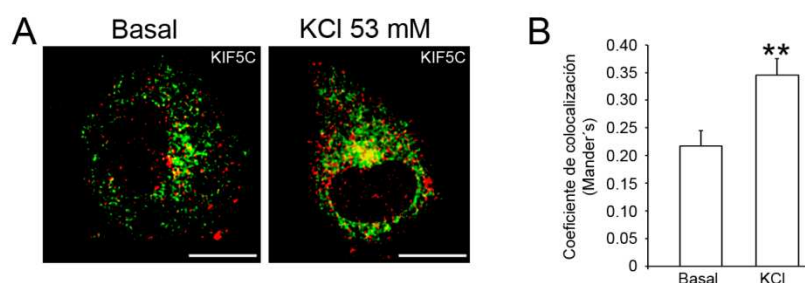


Figura 20: Colocalización de Rab18 con la subunidad pesada de la quinesina-1 KIF5C. (A) Imágenes representativas de células PC12 transfectadas con KIF5C-GFP (verde) e inmunoteñida frente a Rab18 (rojo), donde se observa el aumento en el índice de colocalización entre KIF5C y Rab18 tras la estimulación con K^+ . Barras de escala, 5 μm . (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes antes y después de la administración de K^+ . **, $P < 0.01$ vs. Basal.

aumentó significativamente tras la administración de KCl ($n = 24$ y $n = 43$ células no tratadas y tratadas, respectivamente).

Para profundizar en los aspectos moleculares que rigen el sistema de anclaje y direccionamiento del *cargo* sobre microtúbulos y que puedan estar relacionados con Rab18, estudiamos otro componente importante de la interfaz entre microtúbulos y vesículas, la huntingtina (HTT). Esta proteína modula el transporte vesicular en ambas direcciones ya que, cuando está fosforilada en Ser421, recluta a la quinesina-1 hacia la vesícula y los haces de microtúbulos, mientras que en su estado no fosforilado, la quinesina-1 se descuelga de la vesícula y se promueve el movimiento retrógrado mediado por dineína (Colin *et al.*, 2008). Para analizar su relación espacial con Rab18, llevamos a cabo doble inmunocitoquímica para HTT y Rab18 en células PC12 en condiciones basales y tras la estimulación de la ruta de secreción regulada con KCl 53 mM. Curiosamente, el grado de colocación de ambas inmunoseñales fue mayor en células PC12 no estimuladas que en células tratadas con KCl. En la Figura 21A se muestran imágenes de microscopía confocal representativas donde se puede observar el mayor grado de colocación de las vesículas positivas para Rab18 con HTT en células no estimuladas (panel izquierdo) con respecto a células estimuladas con K^+ (panel derecho). Numéricamente, esta disminución supuso un 68,8% con respecto a la situación control (Figura 21B; $n = 14$ y 25 células control y tratadas, respectivamente).

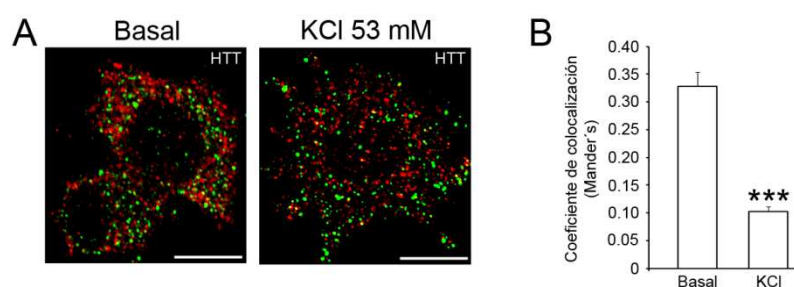


Figura 21: Colocalización de Rab18 con huntingtina. (A) Imágenes de microscopía confocal de células PC12 doblemente inmunoteñidas para Rab18 (rojo) y HTT (verde). Como se puede observar, existe un mayor grado de coincidencia entre las señales fluorescentes en condiciones basales que tras la estimulación de la ruta secretora. Barras de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocación medio que muestran ambas señales fluorescentes antes y después de la administración de K^+ . ***, $P < 0.001$ vs. Basal.

Por otra parte, analizamos la posible interacción física de Rab18 tanto con quinesina-1 como con HTT y su relación con el estado de actividad de la GTPasa mediante *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET). La eficiencia de FRET,

obtenida mediante el método del triple filtro (ver Material y Métodos), se calculó como el porcentaje de FRET relativo al control positivo (células que expresan la proteína quimera CFP-15aa-YFP), considerando un valor de eficiencia de FRET máximo del 50% cuando CFP e YFP se encuentran a la distancia de Förster. Esta aproximación experimental reveló que el grado de interacción entre Rab18 y la cadena ligera de la quinesina-1 (KLC) es mínimo en células no estimuladas con KCl, como indican los valores numéricos de eficiencia de FRET obtenidos con la pareja de proteínas CFP-KLC/YFP-Rab18 que fueron, no obstante, 7 veces mayores que los observados en células transfectadas con los vectores de expresión CFP e YFP vacíos ($-0.90 \pm 1.21\%$ vs. $-6.99 \pm 1.29\%$ en células que expresan CFP-KLC/YFP-Rab18 o CFP/YFP, respectivamente). La interacción de Rab18 con KLC fue, sin embargo, evidente cuando la ruta de secreción regulada fue estimulada mediante un pulso despolarizante de K^+ o cuando se usó el mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L). Bajo estas condiciones, los valores de eficiencia de FRET obtenidos fueron $5.23 \pm 0.21\%$ (tras el tratamiento con K^+) y $5.74 \pm 0.70\%$ [en células transfectadas con Rab18(Q67L)] significativamente mayores que los obtenidos en células transfectadas con la pareja de FRET CFP/YFP (Figura 22).

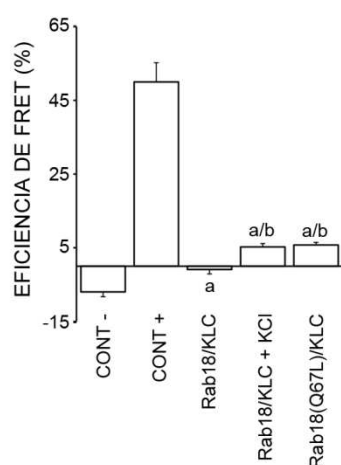


Figura 22: Aplicación de la metodología de FRET para la determinación de la interacción física de Rab18 con KLC en células fijadas. Células PC12 transfectadas con CFP-KLC e YFP-Rab18 o CFP-KLC y el mutante constitutivamente activo YFP-Rab18(Q67L) antes y tras la estimulación con K^+ . La activación de Rab18 mediante la aplicación de un pulso de despolarización con K^+ o el uso de la forma de Rab18 constitutivamente unida a GTP inducen la asociación de Rab18 con KLC. a; $P < 0.001$ vs. CONT-, b; $P < 0.001$ vs. Rab18/KLC.

Teniendo en cuenta la ecuación de Förster (ver Material y Métodos), la distancia teórica a la que se encuentran Rab18 y KLC fue de 8.97 ± 0.35 nm (tras el estímulo con K^+) ó 8.31 ± 0.15 nm [en el caso de Rab18(Q67L)], lo que está en consonancia con la distancia que se puede resolver con esta técnica, que oscila entre 2 y 10 nm, y que es comparable al diámetro de la mayoría de las moléculas biológicas (Heyduk, 2002). En conjunto, estos resultados indican que la estimulación de la ruta de

secreción regulada, que implica la activación de Rab18 y su translocación a la superficie de gránulos de secreción (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007), induce la asociación de esta GTPasa con KLC.

Curiosamente, la eficiencia de FRET obtenida cuando se analizó el par de proteínas HTT y Rab18 resultó muy superior a la obtenida con KLC en condiciones basales. Concretamente, en estas condiciones, CFP-HTT e YFP-Rab18 proporcionaron niveles de eficiencia de FRET de $22.04 \pm 2.94\%$, valor que es algo mayor que el límite máximo teórico de eficiencia de FRET alcanzable en un modelo celular homólogo (16.7%). La distancia a la que se encuentran las dos proteínas calculada a partir de la eficiencia de FRET fue de 7.04 ± 0.23 nm. Después de la administración de K^+ o en células transfectadas con el mutante activo, las eficiencias de FRET obtenidas fueron 10.37 y 8.54 veces menores que las observadas en condiciones control ($2.13 \pm 0.41\%$ y $2.58 \pm 0.47\%$, respectivamente), valores que dan lugar a distancias entre las moléculas de 10.52 ± 0.60 y 9.68 ± 0.34 nm y que se encuentran muy cerca del límite de detección de FRET para el par de fluorocromos CFP e YFP (10 nm) (Figura 23).

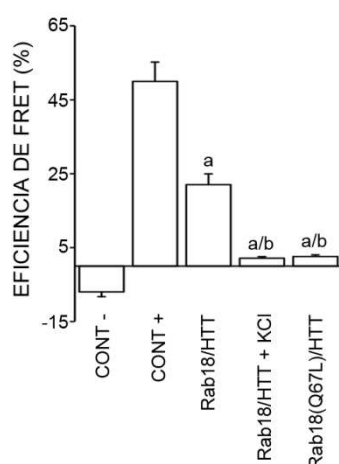


Figura 23: Aplicación de la metodología de FRET para la determinación de la interacción de Rab18 con HTT en células fijadas. Células PC12 transfectadas con CFP-HTT e YFP-Rab18 o CFP-HTT y la forma constitutivamente activa YFP-Rab18(Q67L), antes y tras la estimulación con K^+ . Bajo condiciones basales, las células PC12 que expresan el par Rab18/HTT presentaron un valor de FRET significativamente mayor que el control negativo de la técnica, mientras que tras la administración de K^+ o con el uso de Rab18(Q67L), la eficiencia de FRET disminuyó de manera significativa. a; $P < 0.001$ vs. CONT-, b; $P < 0.001$ vs. Rab18/HTT.

Para explorar la dinámica temporal de la interacción de Rab18 con KLC y HTT, llevamos a cabo medidas simultáneas en tiempo real de la señal de YFP y CFP en células vivas e individuales (ver Material y Métodos). Esta aproximación experimental permitió descubrir que la administración de K^+ causa un aumento rápido del nivel de señal YFP-Rab18 que está acompañado de una disminución paralela del nivel de fluorescencia de CFP-KLC, fenómeno que alcanzó su pico máximo a los 12.50 ± 1.54 s (Figura 24A). Proporcionalmente, el ratio normalizado de YFP/CFP mostró un aumento medio de $5.29 \pm 1.23\%$ como consecuencia de la asociación

rápida de estas proteínas. El aumento del ratio YFP/CFP se mantuvo a lo largo del tiempo de registro (120 s), lo que indica que la asociación de Rab18 y KLC inducida por K^+ es estable y duradera. En cuanto a la asociación de Rab18 y HTT, la medida de la dinámica temporal de FRET reveló que el tratamiento de las células con K^+ provoca una disminución de la señal de YFP-Rab18 y un aumento concomitante de la señal fluorescente de CFP-HTT (Figura 24B), lo que indica que la despolarización inducida por K^+ provoca la disociación de estas proteínas. Como promedio, el proceso de separación de las proteínas dio lugar a una disminución neta del ratio YFP/CFP del $19.94 \pm 6.04\%$, alcanzó su pico mínimo a los 18.00 ± 3.54 s y permaneció reducido durante todo el período de registro (120 s).

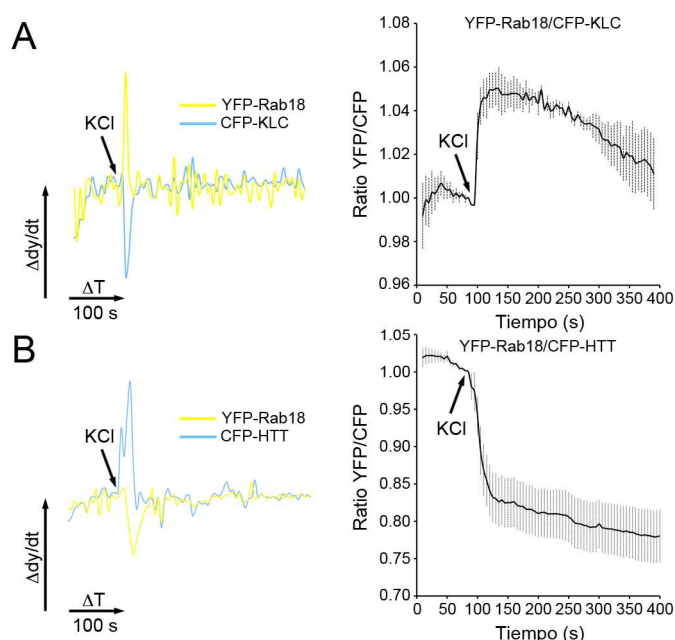


Figura 24: Aplicación de la técnica de FRET en tiempo real para determinar la dinámica de la interacción de Rab18 con KLC y HTT en células vivas antes y después de la administración de K^+ . (A) Células transfectadas con CFP-KLC e YFP-Rab18. Tras el tratamiento con K^+ , se observó un aumento de la intensidad de YFP y una bajada de la de CFP, lo que revela que CFP está a una distancia inferior de 10 nm de YFP y, por tanto, que su energía de emisión excita a YFP, lo que se puede resumir en un aumento en el ratio CFP/YFP. (B) Células PC12 transfectadas con CFP-HTT e YFP-Rab18. El tratamiento de las células con KCl produjo un aumento de la intensidad de CFP y una bajada de la correspondiente a YFP y, por

tanto, una disminución de la transmisión de excitación de CFP a YFP, lo que es indicativo de la separación de los dos marcadores.

Dado que la interacción de HTT y Rab18 ocurre principalmente cuando la GTPasa se encuentra en su estado inactivo, contemplamos la posibilidad de que su unión a esta proteína podría facilitar el intercambio de GDP por GTP y, con ello, activar la GTPasa. En este contexto, cabría esperar que variaciones en la cantidad de HTT provocaran alteraciones en la proporción de Rab18 translocada a la superficie de los gránulos de secreción en respuesta a estímulos secretores. Así pues, se diseñaron experimentos de sobreexpresión de HTT seguidos de fraccionamiento celular y *Western blot* para Rab18 para determinar la influencia de esta proteína sobre la proporción de Rab18 citosólico y de membrana. En la Figura 25A se muestra un *blot*

representativo del extracto proteico total de células transfectadas con un plásmido *mock* (panel izquierdo) y células que sobreexpresan HTT (panel derecho) y en la Figura 25B se representa un blot representativo de la cantidad de Rab18 en fracciones citosólicas y en fracciones de membrana. Como se observa en esta última, en células transfectadas con el plásmido *mock* la proporción de Rab18 asociada a membrana fue menor que la porción citosólica, mientras que en células que sobreexpresan HTT la cantidad de Rab18 asociada a membrana con respecto a la porción citosólica aumentó de manera considerable. Estos datos sugieren que existe una relación funcional directa entre la producción de HTT y la capacidad de Rab18 de unirse a los gránulos de secreción en respuesta a estímulos secretores y, por tanto, apoyan la idea de que HTT podría facilitar el reclutamiento y la interacción de GEFs con la GTPasa.

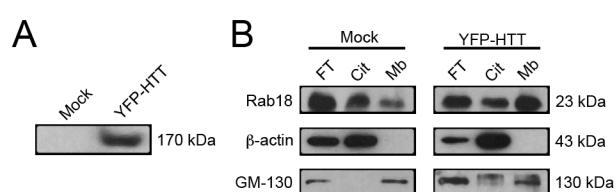


Figura 25: La sobreexpresión de HTT aumenta la unión de Rab18 a membranas. (A) Control de sobreexpresión de YFP-HTT en células PC12. La inmunoreactividad contra YFP sólo pudo ser detectada en células transfectadas con el vector reportero. (B)

Fraccionamiento y *Western blot* en células que sobreexpresan YFP (*mock*) o YFP-HTT. Como se muestra, la inmunoreactividad de Rab18 fue mayor en la fracción citosólica que en la de membrana en condiciones control, mientras que esta última aumentó significativamente en células transfectadas con YFP-HTT. β -actin y GM130 se incluyeron como marcadores de la fracción citosólica y de membrana, respectivamente.

4.4.- La interacción de Rab18 con quinesina-1 inhibe la capacidad de movimiento de la proteína motora

Para dilucidar el significado funcional de la interacción de Rab18 con quinesina-1, analizamos la capacidad de movimiento (procesividad) de este motor molecular mediante video-microscopía usando células COS7 que sobreexpresan el mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L). Así, co-transfectamos células con el vector de expresión que codifica para GFP-KIF5C y con DsRed (células *mock*) o con DsRed-Rab18(Q67L) y, 24 horas más tarde, se procedió al seguimiento de estructuras vesiculares positivas para KIF5C mediante microscopía de fluorescencia. En primer lugar, se obtuvo una imagen de DsRed como referencia para confirmar la sobreexpresión de este vector [con o sin Rab18(Q67L)] en las células monitorizadas. A continuación, se procedió a la adquisición de imágenes de GFP-KIF5C a intervalos de 3 s. Transcurridos 5 min, las células se expusieron a KCl 53 mM que se mantuvo durante el resto de la medida (hasta 10 min de monitorización). En total se obtuvieron

200 imágenes por célula, de las cuales las 100 primeras corresponden al movimiento de vesículas positivas para GFP-KIF5C en condiciones basales y las 100 imágenes restantes muestran el movimiento de estas vesículas tras la estimulación de la ruta secretora. En las Figuras 26A y 26B, así como en el Video 5 incluido en la Información Suplementaria, se muestra un ejemplo representativo de una célula COS7 transfectadas con el vector *mock*. Concretamente, se calcularon distintos parámetros de transporte de gránulos (*i.e.* longitud de la trayectoria y velocidad de los gránulos), prestando especial atención a las variaciones que podían sufrir los mismos en respuesta a la estimulación del proceso secretor. Así, en células transfectadas con el vector *mock*, la velocidad media de los gránulos positivos para GFP-KIF5C fue de $0.16 \pm 0.003 \mu\text{m/s}$ y el coeficiente de difusión de $0.62 \pm 0.03 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$. Por otra parte, la exposición de las células a la solución de K^+ produjo un aumento significativo de la velocidad de los gránulos ($0.19 \pm 0.006 \mu\text{m/s}$) y de su coeficiente de difusión ($0.93 \pm 0.07 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$). En la Figura 21C se presentan las comparaciones gráficas de estos parámetros en células COS7 co-transfectadas con DsRed y GFP-KIF5C y monitorizadas bajo condiciones basales y tras la estimulación con K^+ y en la Figura 26D se muestra un ejemplo representativo de la tendencia de la velocidad a lo largo del tiempo de una vesícula positiva asociada a GFP-KIF5C antes y después de la estimulación de la ruta secretora. Como se observa en este último panel, este gránulo, al igual que la mayoría de los gránulos analizados, aumenta rápidamente su velocidad inmediatamente después de la administración de K^+ .

Por su parte, en células COS7 transfectadas con el mutante constitutivamente activo de Rab18 (Figuras 27A y 27B, así como el Video 6 incluido en la Información Suplementaria), la cinética del desplazamiento de las vesículas positivas para GFP-KIF5C en células antes de la estimulación (velocidad $0.13 \pm 0.003 \mu\text{m/s}$; coeficiente de difusión $0.45 \pm 0.02 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$) fue similar a la observada en células no transfectadas con Rab18(Q67L) bajo condiciones basales. Las diferencias más llamativas en la dinámica de movilización de quinesina-1 entre ambos grupos de células (*i.e.* células que sobreexpresan Rab18(Q67L) con respecto a células transfectadas con el vector DsRed) se observaron tras la estimulación con K^+ . Así, al

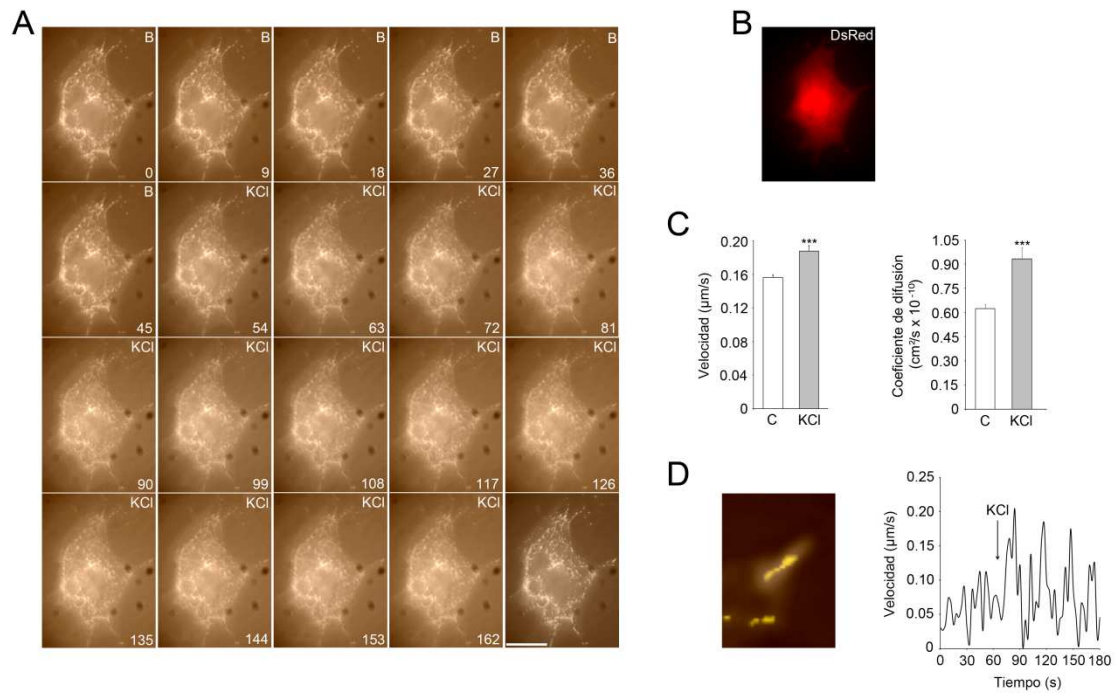


Figura 26: Video-microscopía en células vivas transfectadas con DsRed (*mock*) y GFP-KIF5C, monitorizadas en condiciones basales y tras un estímulo con K⁺. (A) Célula *mock* representativa en la que se muestra la capacidad de movimiento de KIF5C a lo largo de microtúbulos. Barra de escala, 5 µm (B) Imagen representativa de la expresión del vector DsRed en la célula analizada. (C) Comparación entre los diferentes parámetros del experimento. La exposición de las células a la solución de KCl produjo un aumento significativo de la velocidad media y en el coeficiente de difusión. (D) Patrón de movimiento de un gránulo positivo para DsRed-Rab18(Q67L) antes y después del tratamiento con K⁺. *** $P < 0.001$ vs. C.

contrario de lo observado en las células que no expresaban Rab18(Q67L), la velocidad media de las vesículas positivas para GFP-KIF5C a lo largo de las trayectorias en células que se transfectaron con Rab18(Q67L) disminuyó tras la administración de K⁺ (0.09 ± 0.003 µm/s; Figura 27C). Igualmente, el coeficiente de difusión se vio reducido significativamente con respecto al período previo al tratamiento ($0.29 \pm 0.06 \times 10^{-10}$ cm²/s, respectivamente; Figura 22C). En la Figura 27D se muestra un ejemplo representativo del patrón de movimiento de KIF5C antes y después del tratamiento con K⁺.

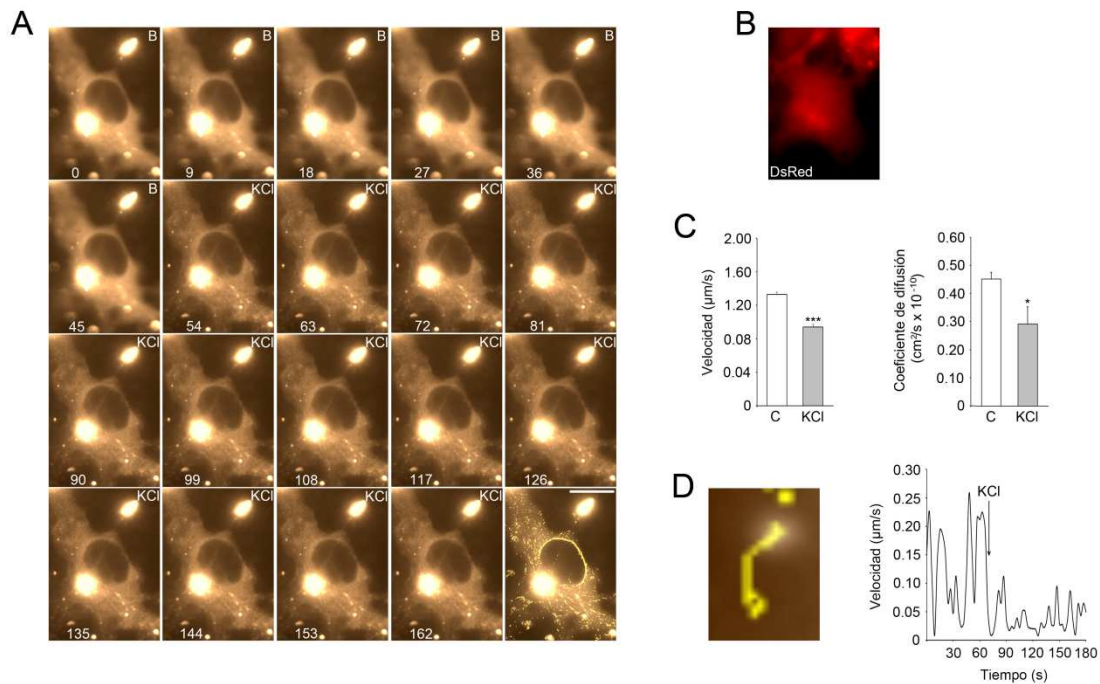


Figura 27: Estudios de video-microscopía en tiempo real de células transfectadas con DsRed-Rab18(Q67L) y GFP-KIF5C, monitorizadas en condiciones basales y tras estimulación con K^+ . (A) Ejemplo representativo de los gránulos positivos para KIF5C, subrayando las diferentes trayectorias que siguen dichos gránulos. Barra de escala, 5 μm . (B) Imagen representativa de la expresión del vector DsRed-Rab18(Q67L) en células transfectadas con dicho vector. (C) Comparación entre la velocidad media y el coeficiente de difusión antes y tras el estímulo con KCl . La velocidad de desplazamiento de las vesículas positivas para GFP-KIF5C en células disminuyó de manera significativa tras la adición de K^+ . (D) Ejemplo del patrón de movimiento dependiente de KIF5C de un gránulo antes y después del tratamiento con K^+ . ***, $P < 0.001$; * $P < 0.05$ vs. C.

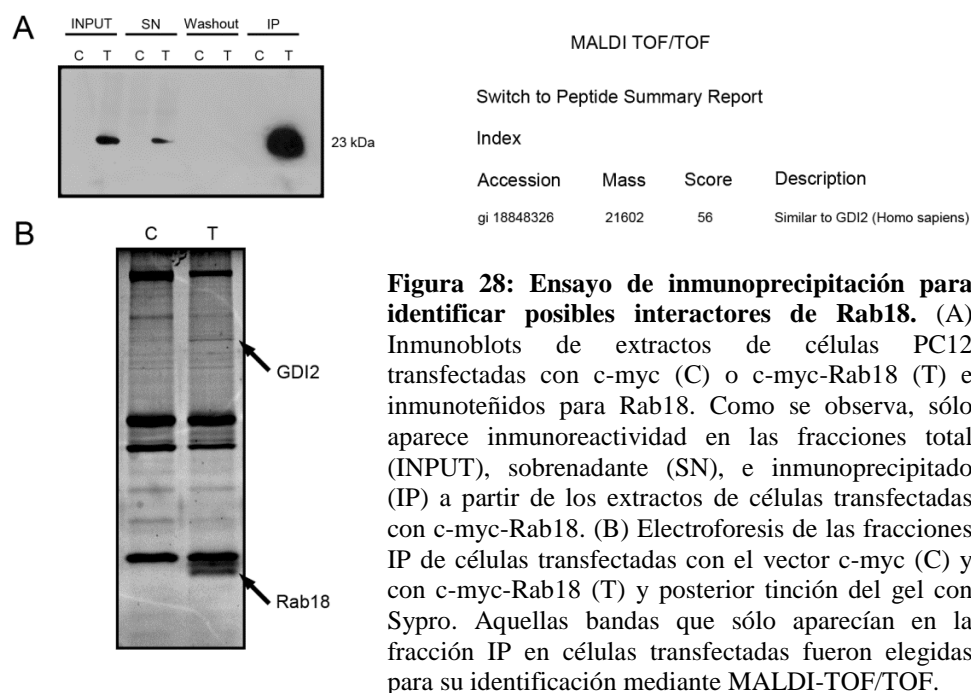
4.5.- Búsqueda de otras proteínas de interacción con Rab18 en células neuroendocrinas

A continuación, y con el fin de comprender mejor el modo de acción de Rab18, nos propusimos ampliar la lista de efectores de la GTPasa. El estudio del interactoma de Rab18 se llevó a cabo siguiendo una estrategia que incluye diferentes aproximaciones experimentales: inmunoprecipitación, cromatografía líquida FPLC (ÄKTA Prime Plus; GE Healthcare), y ensayo de doble híbrido de levadura (*Yeast Two-Hybrid*).

4.5.1.- Inmunoprecipitación

Mediante la inmunoprecipitación en células PC12 transfectadas con un vector de expresión que codifica c-myc-Rab18, pudimos aislar una proteína que sólo aparecía en los extractos de proteínas que habían sido inmunoprecipitados utilizando el anticuerpo para c-myc (Figura 28). En la Figura 28A se muestran los controles de la técnica, que incluyen la comprobación de la ausencia o presencia de Rab18 en las

fracciones obtenidas a partir del extracto total (INPUT), sobrenadante (SN), tras lavar la columna de inmunoprecipitación (Washout) y tras la elución de las proteínas retenidas en la columna (IP) en extractos de células transfectadas con un vector *mock* (C) o con c-myc-Rab18 (T).



En la Figura 28B se comparan los patrones de migración diferencial de las fracciones IP de células transfectadas con el vector *mock* (C) o con c-myc-Rab18 (T). En esta última figura, cabe destacar la presencia de una banda de aproximadamente 80 kDa en la fracción IP obtenida a partir de células transfectadas con c-myc-Rab18 que no estaba presente en la misma fracción de células transfectadas con el vector *mock*. Esta proteína fue identificada por MALDI-TOF/TOF como la proteína *Rab GDP dissociation inhibitor-2* (GDI2) (Figura 28B), que, como se ha mencionado en la Introducción, interacciona con GTPasas Rab impidiendo que éstas unan GTP y se anclen a sus membranas diana, por lo que mantienen a las proteínas Rab en el citosol en su estado inactivo (Pfeffer y Aivazian, 2004).

Para comprobar si la asociación de GDI2 con Rab18 afecta a la movilidad neta de los gránulos de secreción, analizamos el movimiento de las vesículas positivas para NPY-GFP en estado basal y tras el estímulo con K^+ en células carentes de ruta de secreción regulada (COS-7) y en la línea celular neuroendocrina PC12 transfectadas con DsRed-GDI2. Así, se co-transfectaron células con el vector de expresión que

codifica para NPY-GFP y con el vector DsRed (*mock*) o con DsRed-GDI2, y después de 24 h de co-transfección, se monitorizó el movimiento de las vesículas positivas para NPY-GFP antes y después de la administración de un pulso despolarizante de K^+ . De la misma manera que durante el análisis de la procesividad de KIF5C, se adquirieron imágenes de NPY-GFP a intervalos de 3 s, recogiendo un total de 200 imágenes por célula, de la cuales las 100 primeras corresponden al movimiento de vesículas positivas para NPY-GFP en condiciones basales y las 100 imágenes restantes muestran el movimiento de estas vesículas tras la estimulación de la ruta de secreción regulada. En las Figuras 29A y 29B, así como en el Video 7 incluido en la Información Suplementaria se muestra un ejemplo representativo de una célula COS-7 transfectada con DsRed (*mock*) para la que se calculó la velocidad ($0.14 \pm 0.001 \mu\text{m/s}$) y el coeficiente de difusión ($0.53 \pm 0.01 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$) de los gránulos positivos para NPY-GFP. Tal como se refleja en la Figura 29C, el tratamiento con KCl indujo un aumento significativo de la velocidad de los gránulos ($0.16 \pm 0.001 \mu\text{m/s}$) y de su coeficiente de difusión ($0.63 \pm 0.01 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$). Y en la Figura 29D se muestra un

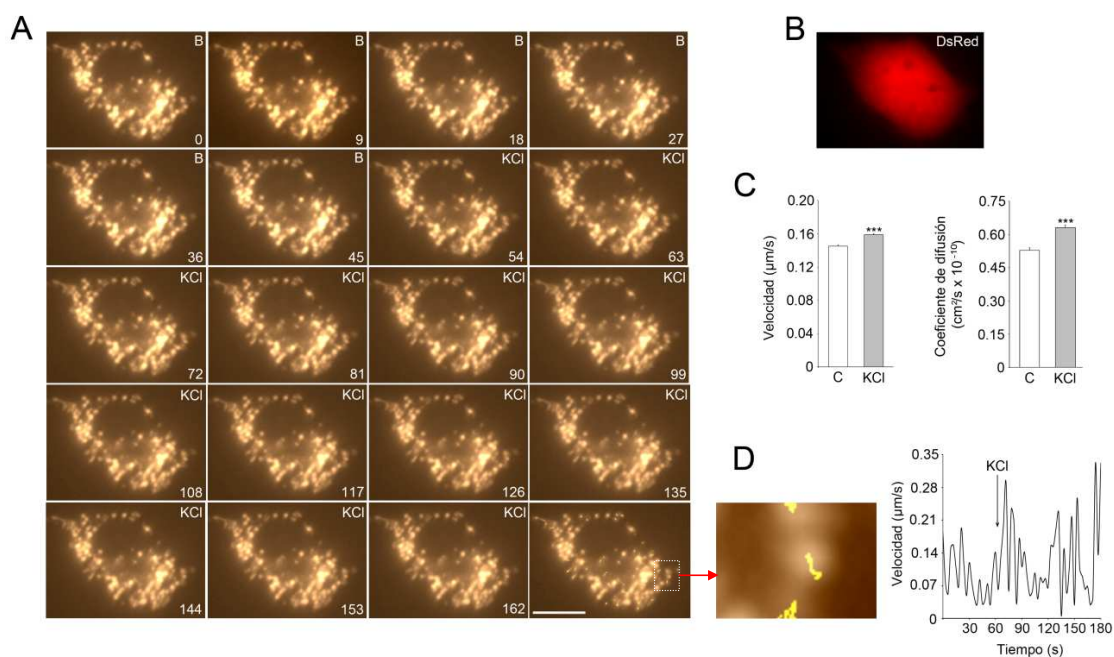


Figura 29: Seguimiento temporal de la dinámica del movimiento de gránulos positivos para NPY-GFP en células COS-7 transfectadas con DsRed (*mock*). (A) Célula representativa en la que se ha monitorizado el movimiento de los gránulos de secreción que contienen NPY-GFP. Barra de escala, 5 μm . (B) Comprobación de la transfección con el vector DsRed. (C) Comparación gráfica de los diferentes parámetros analizados en el experimento. La estimulación de las células con K^+ provocó un aumento significativo de la velocidad (14.3%) y el coeficiente de difusión (18.9%) de los gránulos que presentan NPY. (D) Ejemplo representativo del patrón de movimiento de un gránulo positivo para NPY-GFP antes y después del tratamiento con K^+ . ***, $P < 0.001$ vs. C.

ejemplo representativo de la tendencia de la velocidad a lo largo del tiempo de una vesícula positiva asociada a NPY-GFP antes y después de la estimulación de la ruta secretora. Como se observa en este último panel, este gránulo, al igual que la mayoría de los gránulos analizados, aumenta rápidamente su velocidad inmediatamente tras la administración de K^+ .

Por otra parte, en las Figuras 30A y 30B, y en el Video 8 incluido en la Información Suplementaria se muestra la cinética del desplazamiento de las vesículas positivas para NPY-GFP en células COS-7 que sobreexpresan DsRed-GDI2. Así, en condiciones basales los valores de velocidad de los gránulos ($0.15 \pm 0.003 \mu\text{m/s}$) y su coeficiente de difusión ($0.60 \pm 0.024 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$) fueron similares a los obtenidos en células transfectadas con el plásmido DsRed (*mock*). Asimismo, tras la administración de K^+ , la velocidad ($0.20 \pm 0.003 \mu\text{m/s}$) y el coeficiente de difusión ($1.01 \pm 0.08 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$) aumentaron, al igual que ocurrió en células transfectadas con DsRed, aunque en este caso el aumento resultó significativamente mayor que en las células transfectadas con el vector *mock*. En la Figura 30C se presentan las comparaciones numéricas de estos parámetros en células COS-7 co-transfectadas con

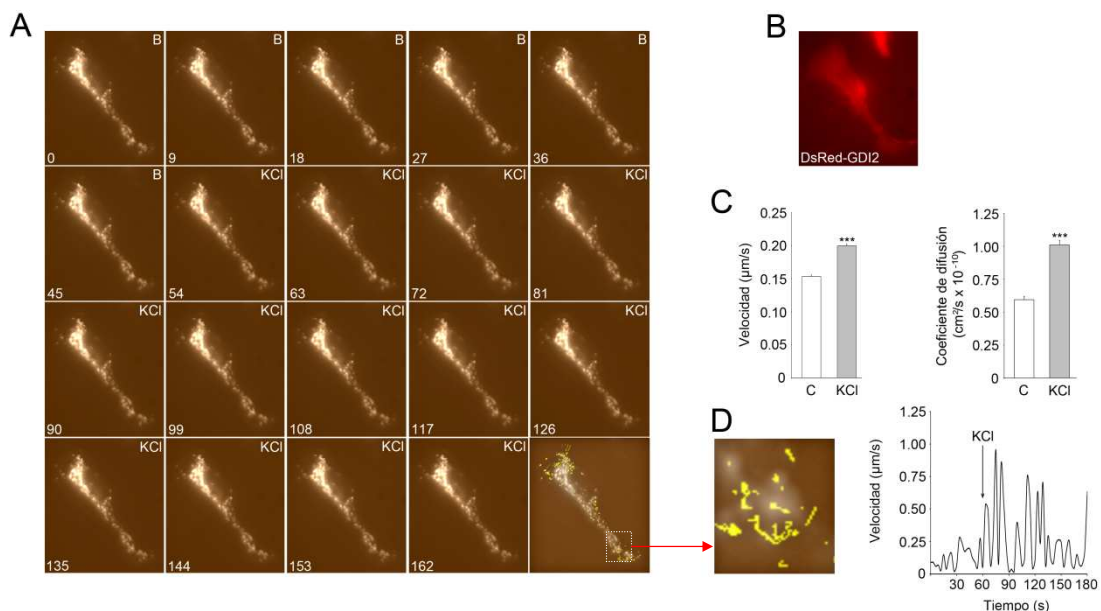


Figura 30: Estudios de video-microscopía en células COS-7 co-transfectadas con DsRed-GDI2 y GFP-NPY y monitorizadas antes y después de la administración de K^+ . (A) Ejemplo representativo del movimiento de los gránulos de secreción que contienen NPY-GFP en una célula COS-7 que expresa DsRed-GDI2 y NPY-GFP. Barra de escala, 5 μm . (B) Imagen de referencia de la señal de DsRed-GDI2 en la célula mostrada en (A). (C) Comparación de la velocidad media y del coeficiente de difusión de los gránulos positivos para NPY-GFP antes y después del tratamiento con KCl. La estimulación de las células provocó un aumento de la velocidad media (33.3%) y del coeficiente de difusión (68.3%) de los gránulos. (D) Ejemplo representativo del patrón de movimiento de un gránulo positivo para NPY-GFP antes y después del tratamiento con K^+ . ***, $P < 0.001$ vs. C.

DsRed-GDI2 y NPY-GFP y monitorizadas bajo condiciones basales (C) y tras la estimulación con K^+ (KCl) y en la Figura 30D se muestra un ejemplo representativo de la trayectoria y la velocidad a lo largo del tiempo de un gránulo con NPY-GFP en estas células.

Esta aproximación experimental también fue llevada a cabo en células PC12, que presentan una ruta de secreción regulada canónica. Así, mientras que en células *mock* el tratamiento con K^+ indujo aumentos modestos de la velocidad de los gránulos de secreción que contienen NPY-GFP ($0.16 \pm 0.025 \mu\text{m/s}$ vs. $0.20 \pm 0.033 \mu\text{m/s}$, antes y después de la administración de K^+ , respectivamente) y su coeficiente de difusión ($0.71 \pm 0.23 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ vs. $1.15 \pm 0.38 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, antes y después de la administración de K^+ , respectivamente), en células que sobreexpresan GDI2, la movilidad de los gránulos de secreción fue ya mayor en condiciones basales (velocidad: $0.20 \pm 0.011 \mu\text{m/s}$) y, tras la administración de K^+ , aumentó hasta alcanzar $0.25 \pm 0.015 \mu\text{m/s}$. Igualmente, el coeficiente de difusión de los gránulos con NPY fue mayor en células transfectadas con GDI2 que en células *mock* no estimuladas ($1.02 \pm 0.12 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$) y alcanzó un valor de $1.61 \pm 0.19 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ después de la administración de K^+ . En las Figuras 31 y 32 y en los Videos 9 y 10 incluidos en la Información Suplementaria se muestran ejemplos representativos de una célula PC12 co-transfectada con el vector DsRed y NPY-GFP (Figura 31) y de una célula co-transfectada con DsRed-GDI2 y NPY-GFP (Figura 32), así como las comparaciones estadísticas de los valores medios.

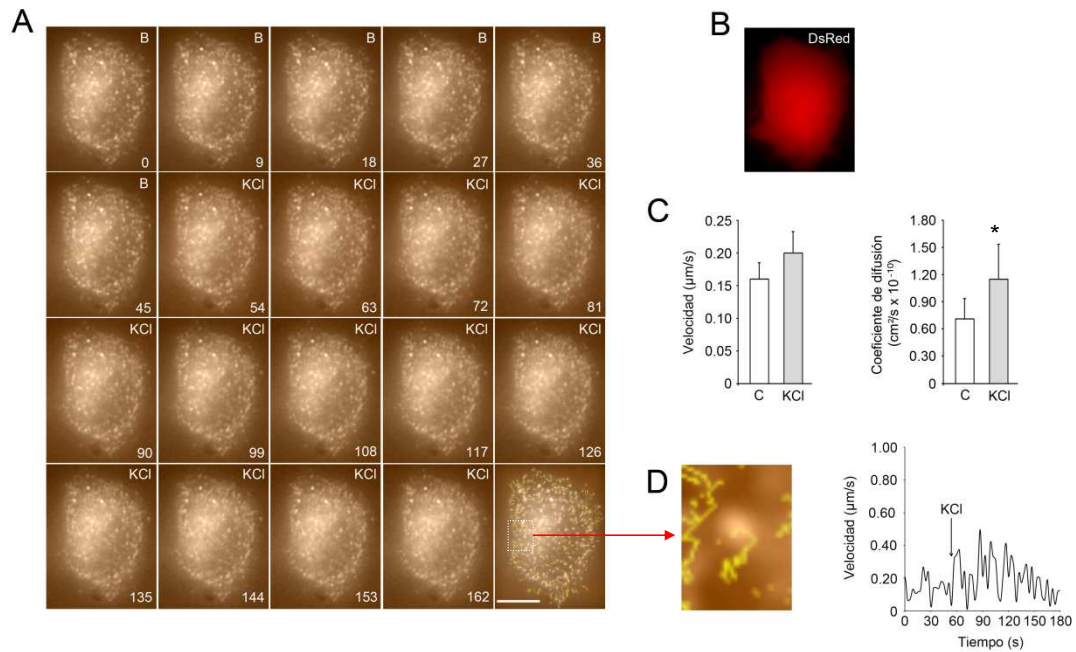


Figura 31: Estudios de video-microscopía en células PC12 co-transfectadas con DsRed y GFP-NPY y monitorizadas antes y después de la administración de K⁺. (A) Ejemplo representativo del movimiento de los gránulos de secreción que contienen NPY-GFP en una célula PC12 que expresa DsRed y NPY-GFP. Barra de escala, 5 μm. (B) Imagen de referencia de la señal de DsRed en la célula mostrada en (A). (C) Comparación de la velocidad media y del coeficiente de difusión de los gránulos positivos para NPY-GFP antes y después del tratamiento con KCl. La estimulación de las células provocó un aumento de la velocidad media (25%) y del coeficiente de difusión (62%) de los gránulos. (D) Ejemplo representativo del patrón de movimiento de un gránulo positivo para NPY-GFP antes y después del tratamiento con K⁺. *, $P < 0.05$ vs. C.

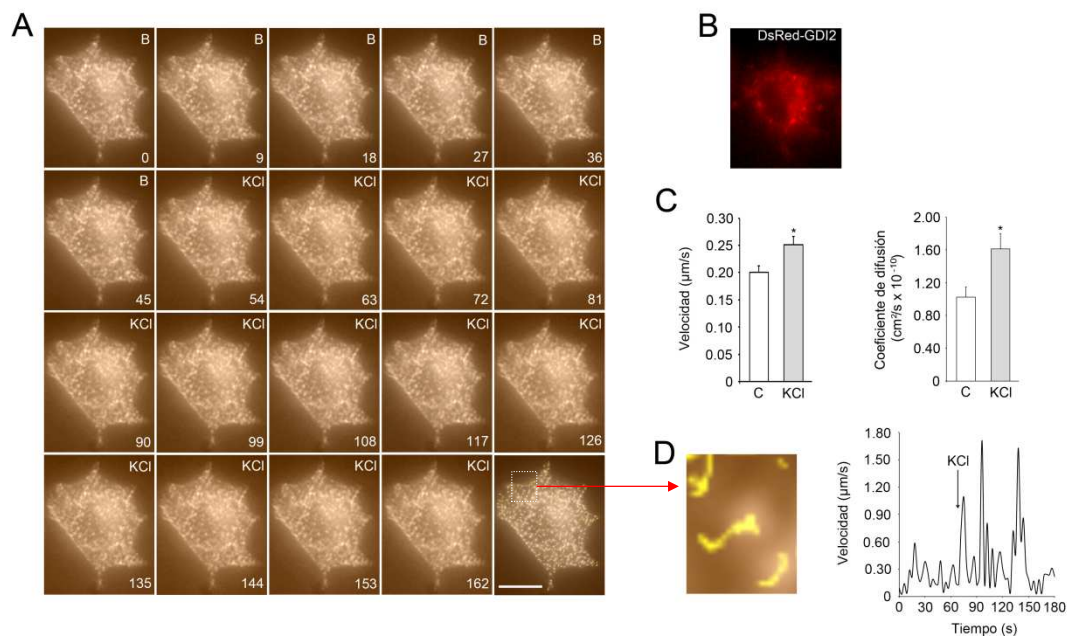


Figura 32: Dinámica del movimiento de gránulos positivos para NPY-GFP en células PC12 que sobreexpresan DsRed-GDI2. (A) Célula representativa en la que se ha monitorizado el movimiento de los gránulos de secreción que contienen NPY-GFP. Barra de escala, 5 μm. (B) Comprobación de la transfección con el vector DsRed-GDI2 en la célula mostrada en (A). (C) Comparación gráfica entre los diferentes parámetros analizados en el experimento. La estimulación de las células con K⁺ provocó un aumento significativo de la velocidad (25%) y del coeficiente de difusión (58%) de los gránulos que presentan NPY. (D) Ejemplo representativo del patrón de movimiento de un gránulo positivo para NPY-GFP antes y después del tratamiento con K⁺. ***, $P < 0.001$ vs. C.

4.5.2.- *Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)*

La cromatografía líquida de alta resolución FPLC nos permitió la purificación y separación de las proteínas de los extractos de células transfectadas con el vector *mock* y de células transfectadas con c-myc-Rab18, utilizando una columna de exclusión de alto peso molecular. Así, tras la separación electroforética de las distintas fracciones bajo condiciones nativas, pudimos determinar la presencia de Rab18 en fracciones enriquecidas en proteínas con pesos moleculares superiores a 25 kDa, lo que implicaba la asociación de la GTPasa con una proteína presente en dicha fracciones. La tinción con rojo Ponceau confirmó la correcta separación de las proteínas según su peso molecular, de manera que éstas se distribuyen de acuerdo a un gradiente decreciente donde en las calles *a*, *b* y *c* abundan proteínas de alto peso molecular (> 75 kDa), mientras que las calles *d*, *e*, *f* y *g* están enriquecidas en proteínas de pesos moleculares menores (< 75 kDa) (Figura 33A). El inmunomarcaje de las proteínas de las membranas de nitrocelulosa con el anticuerpo anti-c-myc demostró que las calles *d* y *e* (Figura 33B) de las fracciones de las células transfectadas con c-myc-Rab18 son las que presentaban un inmunomarcaje más alto, por lo que podrían contener interactores potenciales de la GTPasa. Estas se mezclaron y se enviaron a la unidad de proteómica del Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba (SCAI) para la identificación de las proteínas presentes en las mismas por nano-HPLC-Espectrometría de masas mediante el analizador de trampa de iones. También se identificaron las proteínas de las fracciones *d* y *e* del extracto proteico de las células *mock* que presentaron el mismo perfil de separación para ser nuestro control del experimento. Entre las proteínas identificadas en la fracción *d-e* de células transfectadas con c-myc-Rab18 pero no con el vector *mock*, encontramos una que podía estar relacionada con la regulación de la actividad de las proteínas Rab, la farnesil-bifosfato sintasa [(FDS); también denominada farnesil-pirofosfato sintasa]. Esta enzima interviene en la ruta del mevalonato y, junto con la geranylgeranyl bifosfato sintasa (GGDS) y la geranylgeranyl transferasa (RabGGT), media la síntesis y transferencia de una cadena lipídica de tipo prenilo a las GTPasas Rab, lo que permite a éstas anclarse a la membrana del orgánulo diana una vez activas (Pereira-Leal y Seabra, 2001).

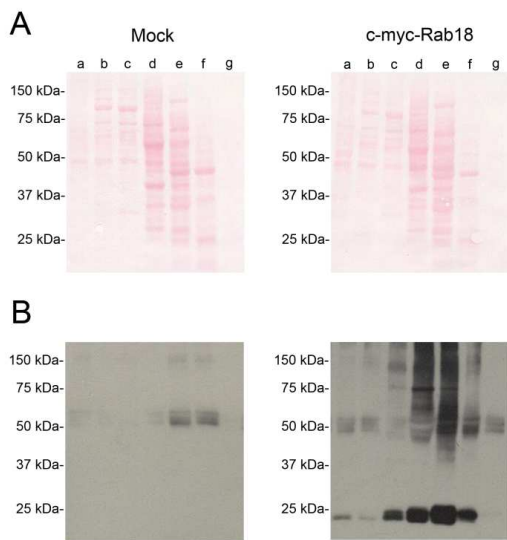


Figura 33: Separación de proteínas según su peso molecular mediante FPLC. Los extractos proteicos de células PC12 transfectadas con el vector *mock* o con *c-myc-Rab18* fueron fraccionados y purificados usando una columna de exclusión molecular para FPLC. (A) Tinción con Ponceau de las membranas de nitrocelulosa, incluyendo las diferentes fracciones obtenidas. Se observa un gradiente de peso molecular en el contenido proteico de las distintas fracciones. (B) La incubación de las membranas mostradas en (A) con el anticuerpo anti-*c-myc* reveló bandas especialmente enriquecidas en *c-myc-Rab18* en las células transfectadas con *c-myc-Rab18*.

4.5.3.-Ensayo de Doble Híbrido de Levadura (*Yeast Two-Hybrid screen; Y2H*)

Esta estrategia de *high-throughput* nos ha permitido ampliar en gran medida la identificación de proteínas que interaccionan con Rab18. Para ello, construimos dos versiones diferentes del vector que expresan la proteína *cebo*: uno codifica para la versión silvestre de Rab18 y el otro codifica para el mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L). Específicamente, realizamos el escrutinio de una librería comercial de cDNA de cerebro de ratón. Para ello, se clonaron los genes de interés en el vector de expresión de levaduras pGBKT7 en el extremo 3' del dominio de unión al ADN de GAL4 (*DNA-BD*), con el que se transfectó la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Y187. A continuación, verificamos la expresión de las proteínas *cebo* en levaduras mediante *Western blot* (Figura 34), que no resultó tóxica para *Saccharomyces* ni alteró su cinética de crecimiento.

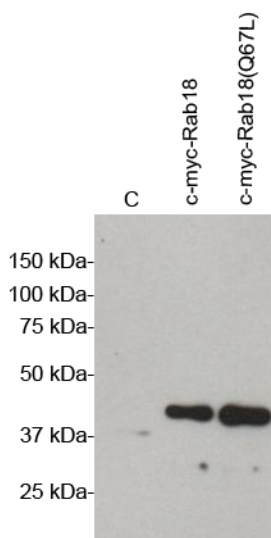


Figura 34: Análisis de la sobreexpresión de Rab18 y Rab18(Q67L) en la cepa de levadura Y187. Extractos de levaduras transfectadas con los vectores pGBKT7-Rab18 o pGBKT7-Rab18(Q67L) y el vector pGBKT7 analizados por *Western blot* para *c-myc*. El inmunomarcado de la membrana de nitrocelulosa con anti-*c-myc* reveló bandas en las muestras de las levaduras transfectadas con pGBKT7-Rab18 y pGBKT7-Rab18(Q67L) y no en el control. El peso correspondiente de estas bandas es de aproximadamente 40 kDa, lo que equivale a la suma de los pesos teóricos de Rab18 y del dominio de unión al ADN de GAL4 que está clonado en el vector pGBKT7 en la misma fase de lectura de Rab18 y de Rab18(Q67L).

Finalmente, se procedió al emparejamiento de las cepas que expresan las proteínas *cebo* con colonias que expresan los diversos fragmentos de ADN de la librería de cerebro de ratón. Las colonias positivas se seleccionaron mediante crecimiento en ausencia de leucina y triptófano (selección de dobles transformantes) y posteriormente se procedió a su crecimiento en ausencia de leucina, triptófano, adenina e histidina y en presencia de α -x-Gal (medio QDO para la selección de dobles transformantes con capacidad de activación de GAL4) (Figura 35).

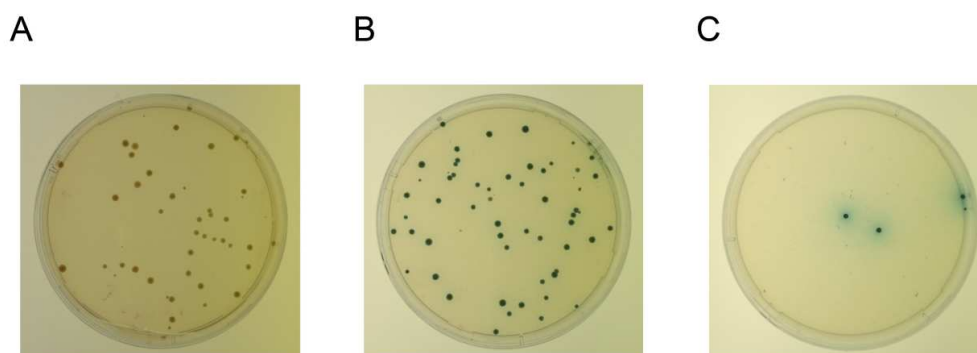


Figura 35: Selección de dobles transformantes con capacidad de activación de GAL4. (A) Control negativo del emparejamiento. Las cepas de levaduras Y2HGold y Y187 se transformaron con los plásmidos pGBKT7-Rec y pGBKT7-Lam, se emparejaron y se sembraron en placas sin leucina, triptófano, adenina e histidina, lo que resultó en el crecimiento de colonias blancas por no tener la capacidad de metabolizar α -x-Gal. (B) Control positivo del emparejamiento. Las cepas de levaduras Y2HGold y Y187 se transformaron con los plásmidos pGBKT7-Rec y pGBKT7-53. Tras el emparejamiento, se sembraron en placas con medio QDO en presencia de α -x-Gal. Tras la incubación, crecieron colonias azules debido a la producción de GAL4 y que, por tanto, son capaces de metabolizar α -x-Gal. (C) Emparejamiento de la cepa que expresa Rab18 con la cepa Y2Hgold transformada con distintos fragmentos de ADN de la librería de cerebro de ratón. La interacción entre la proteína quimera Rab18-Dominio de unión al ADN y cualquier otra proteína que lleve el dominio de activación transcripcional GAL4, permite la activación de los genes reporteros (AUR1-C, ADE2, HIS3 y MEL1) y, por tanto, el crecimiento de colonias azules en el medio QDO con α -x-Gal.

En total, se obtuvieron 23 clones positivos usando como *cebo* la forma silvestre de la GTPasa y 5 clones usando como *cebo* el mutante constitutivamente activo. Tras la extracción y purificación del ADN genómico de las colonias positivas, se llevó a cabo la secuenciación de aquellos fragmentos correspondientes de ADN de la librería. Tras la extracción y purificación del ADN genómico de los clones que presentaron reacción de amplificación (Figura 36), se llevó a cabo la secuenciación de los mismos (Servicio Central de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Córdoba; SCAI). En la Tabla 11 se muestra la lista de proteínas identificadas, incluyendo la función descrita o potencial asignada a cada una de ellas (<http://www.genecards.org/>).

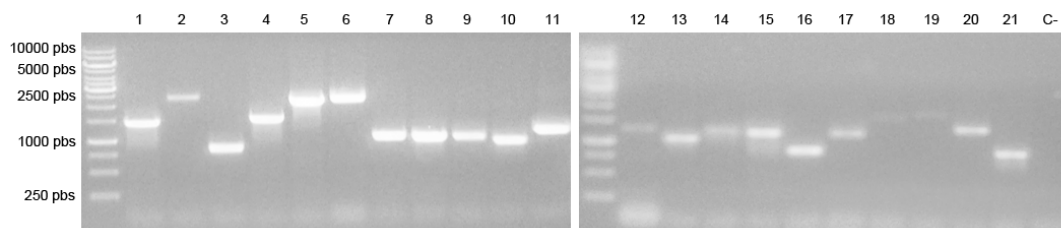


Figura 36: Screening por PCR de las colonias de levaduras positivas. Las colonias que crecieron en medio QDO en presencia de α -x-Gal se picaron y se procesaron según las instrucciones del *kit* de PCR comercial para la amplificación del cDNA de la librería clonada en la cepa Y2HGold. La electroforesis de las mezclas de PCR resultantes demostró la presencia de secuencias de cDNA de diferentes tamaños (250-2500 pbs) que corresponden a genes que codifican para proteínas que interactúan con Rab18.

Tabla 11: Proteínas identificadas mediante Y2H como posibles interactores de la forma silvestre de Rab18 y del mutante activo Rab18(Q67L).

Rab18

Protein	Acronym	PubMed Acces Number	Function
guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha	GNAL	NP_034437.1	Transducción de señal
charged multivesicular body protein 1B	CHMP1B	NP_077152.1	Biogénesis de endosomas
POU domain, class 6, transcription factor 2	POU6F2	NP_778171.2	Regulación de la transcripción
rho guanine nucleotide exchange factor 3	ARHGEF3	NP_082147.1	Intercambiador de nucleótido de guanina
calcineurin subunit B type 1	PPP3R1	NP_077779.2	Regulación de la transcripción
Bardet-Biedl syndrome 1	BBS1	NP_001028300.1	Ciliogénesis
kinesin heavy chain isoform 5C	KIF5C	NP_032475.2	Tráfico celular
succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit	SDHA	NP_075770.1	Cadena respiratoria
sodium/hydrogen exchanger 8 isoform a	SLC9A8	NP_683731.1	Transducción de señal
sodium/hydrogen exchanger 8 isoform b	SLC9A8	NP_848458.2	Transducción de señal
importin-13	IPO13	NP_666264.1	Transporte nuclear
histone-binding protein RBBP7	RBBP7	NP_033057.3	Estructura de nucleosoma
pallidin	BLOC1S6/PLDN	NP_062762.1	Biogénesis de lisosomas
serine/arginine-rich splicing factor 12	SREK1	NP_808442.2	Regulación de la transcripción
proline-rich nuclear receptor coactivator 1	PNRC1	NP_001028397.2	Transducción de señal
choline/ethanolaminephosphotransferase 1	CEPT1	NP_598630.2	Transporte fosfolípidos
ras-GEF domain-containing family member 1B isoform 1	RASGEF1B	NP_665838.1	Intercambiador de nucleótido de guanina
ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 11	USP11	NP_663603.3	Ubiquitinación
serine/threonine-protein kinase A-Raf isoform 1	ARAF	NP_033833	Transducción de señal
serine/threonine-protein kinase A-Raf isoform 2	ARAF	NP_001153117	Transducción de señal
MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol	MDGA2	NP_001180195.1	Interacción celular
dysbindin domain-containing protein 2	DBNDD2	NP_001041692.1	
dynammin-3 isoform 1/dynammin-3 isoform 2	DNM3	NP_001033708.1/NP_766234.1	Tráfico celular

Rab18(Q67L)

Protein	Acronym	PubMed Acces Number	Function
histone H2A type 3	HIST1H2AD	NP_835736.1	Estructura de nucleosoma
E3 ubiquitin-protein ligase TRIM17	TRIM17	NP_112449.1	Ubiquitinación
cullin-4A	CUL4A	NP_666319.2	Ubiquitinación
lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor	LAMP1	NP_034814.2	Estructura de lisosomas
F-actin-capping protein subunit alpha-3	CAPZA3	NP_031631.3	Morfogénesis celular

Del total de proteínas identificadas con la forma silvestre de Rab18, cabe destacar la isoforma KIF5C de la cadena pesada de la quinesina-1, lo que confirma los resultados de inmunolocalización y FRET presentados en los apartados anteriores. Además, encontramos otras proteínas implicadas en el tráfico intracelular (*i.e.* DNM3), proteínas intercambiadoras de nucleótidos de guanina (*i.e.* ARHGEF3 y

RASGEF1B), varias isoformas de proteínas quinasas (*i.e.* isoformas 1 y 2 de ARAF), enzimas (*i.e.* SDHA, CEPT1, CoA-isomerasa, USP11) y proteínas involucradas en la biogénesis de endosomas (*i.e.* CHMP1B) y lisosomas (*i.e.* *pallidin*). En el caso concreto de *pallidin*, esta proteína forma parte de un complejo multiproteico (BLOC-1; *biogenesis of lysosome-related organelles complex*) al que también pertenecen *muted*, *cappuccino* y *dysbindin* (Falcon-Perez *et al.*, 2002). Esta última proteína es estructuralmente parecida a DBNDD2, lo que nos condujo a pensar que también podrían estar funcionalmente relacionadas. Recientemente, se ha demostrado que BLOC-1 no sólo regula la función lisosomal, sino también la biogénesis de gránulos, el tráfico de vesículas sinápticas, la clasificación de proteínas y ciertos eventos de fusión de membranas (Larimore *et al.*, 2011). Además, el complejo BLOC-1 interacciona con varias proteínas Rab (*i.e.* Rab11, Rab32 y Ra38), por lo que se ha sugerido que BLOC-1 puede funcionar como complejo efector de estas GTPasas (Hermann *et al.*, 2012). Así pues, nos propusimos confirmar y profundizar en la relación funcional entre Rab18 y componentes del complejo BLOC-1.

4.5.4.- Localización subcelular de posibles efectores de Rab18

En primer lugar, realizamos estudios de localización intracelular de Rab18 y *pallidin* o DBNDD2, para lo cual células PC12 se transfectaron con los vectores de expresión GFP-*pallidin*, (donado generosamente por el Dr. Juan S. Bonifacino, *National Institute of Health*; EEUU) o DsRed-DBNDD2 (clonado por nosotros durante el transcurso de este trabajo). Tras 24 h, las células se trataron o no con solución de KCl 53 mM y finalmente se inmunotñieron para Rab18.

En células transfectadas con el vector GFP-*pallidin*, la señal fluorescente se asoció a estructuras de tipo vesicular (Figura 37A). En cuanto a la relación de esta proteína con Rab18, nuestros análisis de colocalización mostraron que, en estado basal, una cierta proporción de las vesículas Rab18-positivas muestran también inmunomarcaje para este componente del complejo BLOC-1 (Figura 37A). El grado de coincidencia espacial entre ambos marcadores fue más evidente tras la estimulación de la ruta de secreción regulada (Figura 37A). Numéricamente, el aumento de la colocalización entre las vesículas positivas para Rab18 y *pallidin* inducido por K⁺ fue del 72% (n = 21 y 22 células no estimuladas y estimuladas, respectivamente; Figura 37B).

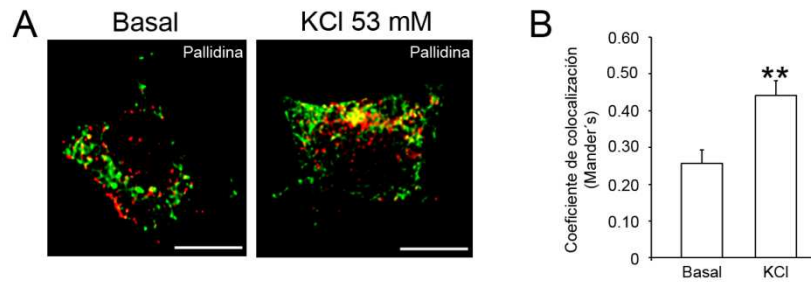


Figura 37: Colocalización de Rab18 con pallidin. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células PC12 que expresan GFP-pallidin (verde) e inmunoteñidas contra Rab18 (rojo). Como se puede observar, el solapamiento de ambas señales fluorescentes (amarillo) aumentó tras el estímulo con KCl. Barras de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio entre Rab18 y pallidin. **, $P < 0.01$ vs. Basal.

Por otra parte, también analizamos la relación espacial entre los gránulos de secreción positivos para Rab18 y DNBDD2. Para ello, transfectamos células PC12 con DsRed-DBNDD2 y posteriormente inmunoteñimos las células contra Rab18. Como se puede observar en la Figura 38A, que muestra células representativas en condiciones basales (panel izquierdo) y tras la estimulación de la ruta de secreción regulada (panel derecho), la coincidencia espacial de ambas señales fluorescentes fue significativamente menor (29%; $n = 17$ y 19 células no estimuladas y estimuladas, respectivamente; Figura 38B) en células expuestas a KCl que en células control, lo que sugiere que Rab18 podría interactuar con DNBDD2 previo a la activación de la GTPasa, para posteriormente disociarse de ésta tras la estimulación de la ruta de secreción.

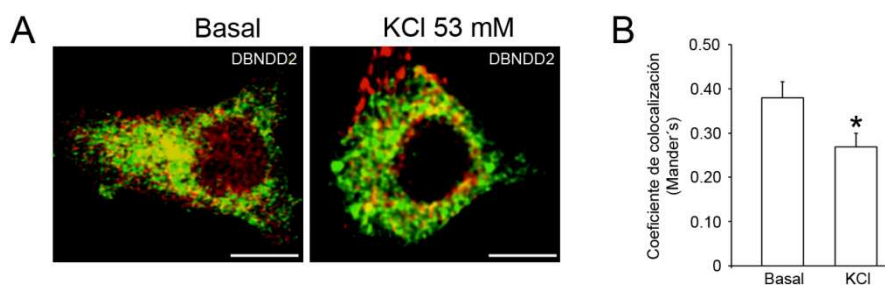


Figura 38: Colocalización de Rab18 con DNBDD2. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células PC12 que expresan GFP-DBNDD2 (verde) e inmunoteñidas para Rab18 (rojo). Como se puede observar, la coincidencia de ambas señales fluorescentes (amarillo) disminuyó tras el estímulo con KCl. Barras de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio. *, $P < 0.05$ vs. Basal.

A continuación, estudiamos la relación de Rab18 con una de las proteínas identificadas en el ensayo de Y2H que también está relacionada con lisosomas, LAMP-1. Específicamente, LAMP1 transita entre los varios componentes del sistema

endo-lisosomal (endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas) (Cook *et al.*, 2004). Ya que esta proteína fue identificada como posible efector de la forma activa de Rab18, llevamos a cabo el análisis de colocalización de ambas proteínas en células PC12 estimuladas con KCl. En la Figura 39 se muestra una imagen de microscopía confocal representativa de una célula PC12 doblemente inmunoteñida para Rab18 (rojo) y LAMP1 (verde), en la que se puede apreciar que ambas señales coinciden espacialmente en estructuras vesiculares (coeficiente de colocalización Mander's 0.70 ± 0.019 ; $n = 6$ células).

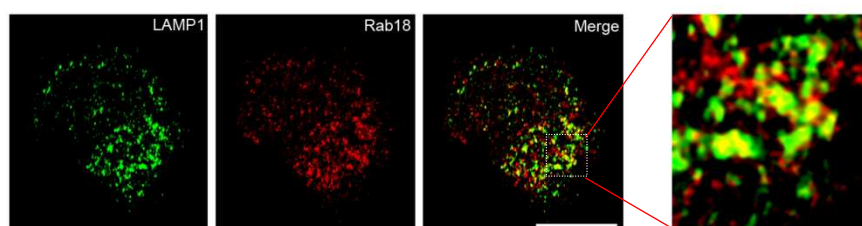


Figura 39: Colocalización de Rab18 con LAMP1. Imágenes representativas de microscopía confocal de células PC12 doblemente inmunoteñidas para LAMP1 (verde) y para Rab18 (rojo). Como se puede observar, existe un cierto grado de colocalización de ambas señales fluorescentes en estructuras vesiculares. Barra de escala, 5 μm .

Finalmente, profundizamos en la posible interacción entre Rab18 y DNM3, una GTPasa que regula la escisión de las vesículas en formación de la membrana del compartimento donador (Ferguson y De Camilli, 2012). Para ello, realizamos doble inmunocitoquímica para Rab18 y DNM3 en células PC12 bajo condiciones basales y tras la estimulación con K^+ . Como se observa en la Figura 40, que muestra células representativas inmunoteñidas para Rab18 (rojo) y DNM3 (verde) (Figura 40A) y la representación gráfica del coeficiente de colocalización medio de ambas señales fluorescentes (Figura 40B), la coincidencia espacial de ambas proteínas aumenta significativamente tras la estimulación de la ruta de secreción regulada ($n = 14$ y 16 células PC12 no estimuladas y estimuladas, respectivamente).

Si bien en un estudio previo demostramos que Rab18 se asocia a gránulos de secreción, ya que éstos contenían productos propios de la ruta de secreción regulada

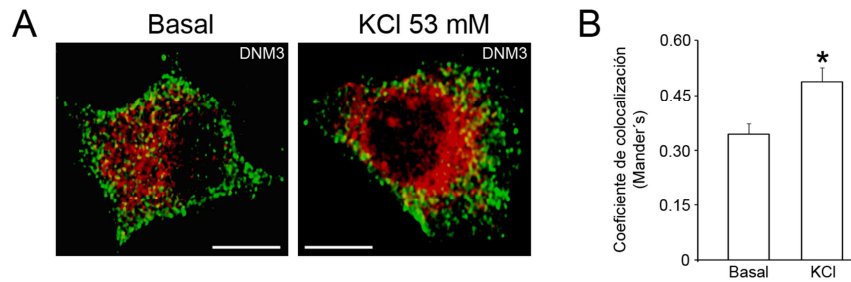


Figura 40: Colocalización de Rab18 con DNM3. (A) Imágenes representativas de microscopía confocal de células PC12 doblemente inmunoteñidas para DNM3 (verde) y para Rab18 (rojo). Como se puede observar, el grado de colocalización en estructuras vesiculares aumenta (50%) tras la administración de KCl. Barra de escala, 5 μ m. (B) Representación gráfica del índice de colocalización medio. *, $P < 0.05$ vs. Basal.

(NPY, ACTH, SgII y CgA) (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007), el hecho de que los resultados del ensayo de doble híbrido de levadura sugieran que Rab18 puede interactuar con ciertas subunidades de complejos proteicos involucrados en la biogénesis de lisosomas y otros compartimentos vesiculares relacionados con éstos (BLOC-1) y se localiza en vesículas que presentan marcadores típicos del sistema endo-lisosomal (LAMP1), nos ha hecho preguntarnos de nuevo por la naturaleza exacta de las vesículas a las que se asocia Rab18. En este sentido, es importante mencionar la existencia de un compartimento intermedio, los ISGs, donde se continúa con el procesamiento proteolítico de los péptidos de secreción almacenados en éstos y con la clasificación y extracción de productos cuyos destinos finales son diferentes a la ruta de secreción regulada, incluyendo enzimas hidrolíticas y proteínas propias de la ruta de secreción constitutiva (Morvan y Tooze, 2008). Por tanto, a continuación exploramos la posibilidad de que Rab18 se asocie a ISGs y, para ello, llevamos a cabo doble inmunocitoquímica para Rab18 y un marcador de ISGs, la sinaptotagmina IV (Ahras *et al.*, 2006; Fukuda *et al.*, 2003), en células PC12 estimuladas o no con KCl. En la Figura 41A se muestran células representativas en condiciones basales (panel izquierdo) y tras la estimulación de la ruta de secreción regulada (panel derecho) y la coincidencia espacial de ambas señales fluorescentes, que fue significativamente mayor (180%; Figura 41B) en células expuestas a KCl que en células control, lo que apoya la idea de que, tras su activación, Rab18 se asocia a ISGs.

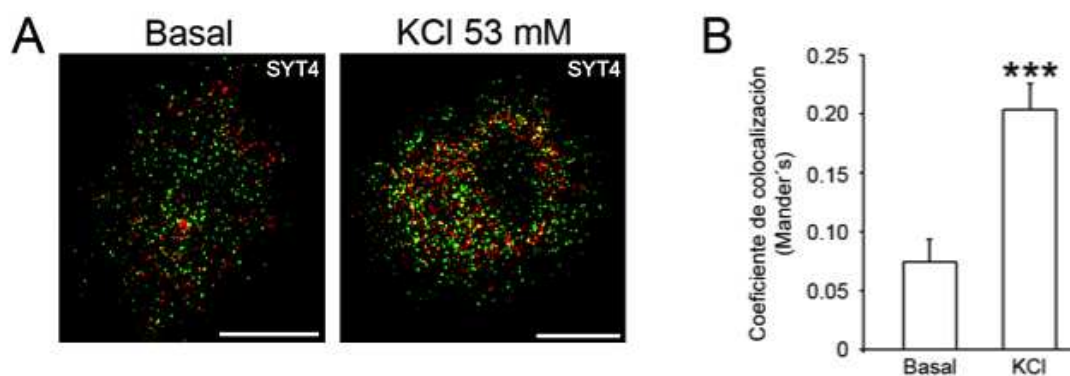


Figura 41: Colocalización de Rab18 con sinaptotagmina IV. (A) Imágenes de microscopía confocal de células PC12 doblemente inmunoteñidas para Rab18 (rojo) y sinaptotagmina IV (verde). Como se puede observar, la estimulación de la ruta secretora aumente el grado de coincidencia entre las señales fluorescentes. Barras de escala, 5 μ m. (B) Coeficiente de colocalización medio que muestran ambas señales fluorescentes antes y después de la administración de K^+ . ***, $P < 0.001$ vs. Basal.

4.6.1.- Rab18 en feocromocitomas humanos

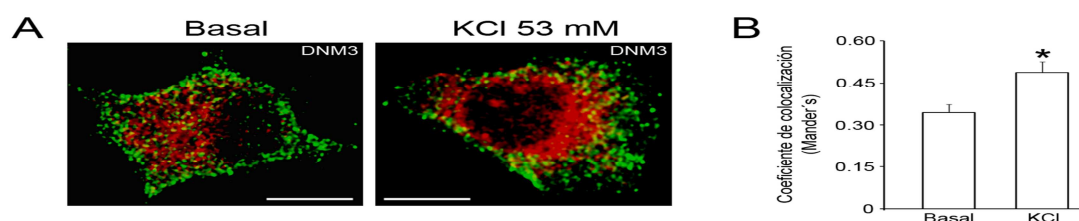
De manera paralela a los estudios de colocalización de Rab18 con las proteínas seleccionadas a partir del ensayo de Y2H, y gracias a la amable colaboración de los Dres. Mercedes Robledo y Aguirre A. de Cubas (CNIO, Madrid), tuvimos la oportunidad de analizar la expresión de Rab18 en microarrays obtenidos a partir de muestras de neoplasias de células derivadas de la cresta neural, procedentes bien de la médula adrenal (*i.e.*, feocromocitomas) o de origen simpático y localización extra-adrenal (*i.e.* paragangliomas) (Timmers *et al.*, 2009). De manera específica, el análisis se realizó sobre muestras de tumores portadores de mutaciones en la línea germinal de genes que se ha demostrado que causan feocromocitoma o paraganglioma hereditario: las subunidades D y B de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDHB y SDHD), el supresor tumoral implicado en la degradación del factor de hipoxia HIF-1 α , Von Hippel–Lindau (VHL), el receptor tirosina quinasa (RET), neurofibromina 1 (NF1), la proteína transmembrana 127 (TMEM127), y el factor de transcripción MAX (MYC-associated factor X) (de Cubas *et al.*, 2013; Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2012; Jimenez *et al.*, 2006). Adicionalmente, los tumores fueron clasificados según su carácter benigno o maligno.

Además de Rab18, y en consonancia con los criterios que aplicamos para seleccionar los genes entre aquellos derivados del análisis de Y2H para los estudios de colocalización, decidimos evaluar también la expresión de *pallidin* (PLDN) en estos tumores, extendiendo en este caso el análisis a otros componentes del complejo BLOC-1, incluyendo *muted*, *snapin* (SNAPAP) y *cappuccino* (CNO) (Bonifacino,

2004). Adicionalmente, investigamos la expresión de DBNDD2 y DNM3, así como la de LAMP-1, ampliando además el estudio a sinaptotagmina IV (SYT4).

En la Tabla 12 se muestran los resultados de expresión de estos genes en los distintos tipos de tumores. Como puede observarse, la expresión de Rab18 fue cuantitativamente menor en todos los tumores investigados en comparación a los niveles de expresión existentes en muestras de médula adrenal normal, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, salvo en el caso de los tumores benignos, para los que disponíamos de un número de muestras mayor que en los otros tipos de tumores. Por el contrario, la expresión de GDI2 fue normalmente mayor en la mayoría de los tumores. Curiosamente, todos los componentes del complejo BLOC-1 mostraban niveles de expresión reducidos en los tumores. Por el contrario, la expresión de DBNDD2 y DNM3 aumentó en los tumores en relación a lo observado en condiciones normales.

Tabla 12: Comparación de la expresión de Rab18 y los posibles interactores de la GTPasa en tumores neuroendocrinos (feocromocitomas y paragangliomas) esporádicos o hereditarios.



GEN	SDHD		RET		NF1		TMEM127		MAX	
	SDHD vs Norm	FDR	RET vs Norm	FDR	NF1 vs Norm	FDR	TMEM127 vs Norm	FDR	MAX vs Norm	FDR
CNO	-0.31	0.7302135	-0.96	0.0009309	-1.29	0.0005585	-1.27	0.002542	-0.68	0.2031591
OSNCO2	1.37	0.0005925	1.95	<0.0000001	1.78	0.0002403	1.53	0.0002905	1.88	0.000279
DNM3	0.74	0.3292058	1.53	9.09E-07	1.62	3.09E-06	1.95	3.49E-06	0.89	0.0615098
GDI2	0.34	0.7302135	0.45	0.1143602	0.26	0.4278589	-0.33	0.5295877	0.84	0.0058309
MUTED	-0.19	0.7854497	0.00	0.9835535	-0.17	0.5535418	-0.11	0.7678117	-0.18	0.6123761
PLDN	-0.05	0.8774577	-0.12	0.9018572	0.42	0.2854518	0.26	0.5739476	0.43	0.3501714
RAB18	-0.21	0.7854497	-0.34	0.3181528	-0.38	0.4116081	-0.77	0.0925004	-0.39	0.432087
SNAPAP	0.09	0.8774577	0.01	0.9835535	-0.40	0.2854518	-0.60	0.1944976	-0.25	0.5566882

De manera adicional a los estudios de expresión, evaluamos la correlación entre la expresión de Rab18 y los otros genes en las muestras de tumores (Tabla 13). En el caso de los tumores benignos que, como hemos indicado, incluye el grupo de tumores más numeroso, encontramos una correlación entre la expresión de Rab18 y la de GDI2, DBNDD2 y DNM3. Es importante resaltar que la correlación entre la GTPasa y GDI2 se mantuvo en otros tipos de tumores (*i.e.*, con mutaciones en VHL, RET, TMEM127 o MAX). Finalmente, la expresión de Rab18 también se correlacionó con la de LAMP1 en los tumores benignos. Ocasionalmente, la expresión de Rab18 correlacionó con la de sinaptotagmina IV (tumores mutantes en NF-1) y,

curiosamente, la expresión de esta proteína correlacionó con la de LAMP1 en todos los tumores analizados.

Tabla 13: Correlaciones en la expresión de los genes de interés con respecto al nivel de expresión de Rab18. En verde se señalan aquellas correlaciones, positivas o negativas, que son estadísticamente significativas.

Por último, destacar que, sobre la base de los resultados encontrados, llevamos a cabo un análisis de los factores de transcripción reguladores de la expresión de Rab18 y LAMP1, así como de sinaptotagmina IV, usando el algoritmo de predicción UNIGENE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene/>). Tal como se muestra en la Tabla 14, Rab18 comparte con LAMP1 22 de los 25 factores de transcripción potencialmente reguladores de esta GTPasa. Por su parte, de los 10 factores de transcripción predichos para sinaptotagmina IV, todos ellos también se identificaron para Rab18 y 9 de ellos para LAMP1.

Tabla 14: Factores de transcripción que regulan la expresión de los genes RAB18, LAMP1 y SYT4. En rojo se muestran aquellos factores que son comunes para los tres genes y se señala subrayado un factor regulador común de la expresión de RAB18 y SYT4.

Gen	Factores de Transcripción
<i>RAB18</i>	H3K27me3, H3K4me3, FOXP3, ETV1, H3K27ac, H3K9ac, H3K4me2, H3K4me1, CTCF, H3K9me3, E2F1, CREBBP, ETS1, ELK4, TRIM28, CDX2, CEBPB, POU5F1, SPI1, H3K79me2, EP300, RNA Pol II, <u>EOMES</u> , GATA3, ESRRA, FOXA1, HNF4A
<i>LAMP1</i>	H3K27me3, H3K4me3, H3K27ac, H3K4me2, H3K9ac, H3K4me1, CTCF, FOXP1, E2F1, CREBBP, ETS1, TRIM28, NFATC1, CTNNB1, CEBPB, POU5F1, SPI1, H3K79me2, EP300, RNA Pol II, GATA3, ESRRA, FOXA1, CDX2, HNF4A

SYT4	H3K27me3, CTCF, H3K4me2, H3K4me3, E2F1, TRIM28, CEBPB, <u>EOMES</u> , FOXA1, H3K4me1
------	--

5.- DISCUSIÓN

La ruta de secreción regulada es un proceso que sucede en múltiples etapas secuenciales estrechamente reguladas (Bonifacino y Glick, 2004). Cada etapa está gobernada por un número importante de proteínas responsables de coordinar espacial y temporalmente los eventos que tienen lugar en un momento determinado. Entre todas las proteínas reguladoras de la ruta de secreción, cabe destacar la familia de las GTPasas de bajo peso molecular Rab, que han sido consideradas como las encargadas de organizar todos los compartimentos membranosos intracelulares y orquestar sus desplazamientos e interrelaciones (Zerial y McBride, 2001). Aunque en las últimas dos décadas se ha avanzado enormemente en la identificación y caracterización funcional de estas GTPasas, dado el elevado número de proteínas Rab expresadas en mamíferos [más de 60 en humanos (Colicelli, 2004; Zerial y McBride, 2001)] y la complejidad del sistema, todavía se desconoce el papel preciso de muchas de estas proteínas en relación al proceso secretor. Una de las proteínas Rab de la que se comienza a tener mayor información es Rab18. Se ha propuesto que Rab18 regula el tráfico de endosomas en células epiteliales (Lutcke *et al.*, 1994), de gotas lipídicas en adipocitos (Martin *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2011), de gránulos de secreción en células (neuro)endocrinas (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007), y de vesículas procedentes de la red *cis* del complejo de Golgi en fibroblastos (Dejgaard *et al.*, 2008). En concreto, en células que poseen una ruta de secreción regulada canónica, como las células (neuro)endocrinas, Rab18 se asocia a gránulos de secreción, lo que conlleva una inhibición de su capacidad de movimiento hacia la membrana plasmática en respuesta a estímulos extracelulares (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares que subyacen en la acción de Rab18 en este compartimento secretor o la trascendencia funcional de dicha acción. En este sentido, en el presente estudio hemos profundizado en los procesos moleculares que vinculan la asociación de Rab18 a la superficie de los gránulos a una disminución de su movimiento. Para ello, hemos investigado la cinética de movimiento de los gránulos de secreción positivos para Rab18 mediante video-microscopía. También hemos abordado la identificación de las proteínas que interaccionan con Rab18 y que, en última instancia, son las responsables de traducir la información química implícita en la GTPasa en información mecánica, mediante una estrategia multifacética que ha incluido estudios de FRET, protocolos de inmunoprecipitación, o de cromatografía líquida combinados con espectrometría de masas y ensayo de doble híbrido de levaduras. Finalmente, estos estudios se han

confirmado y extendido para ciertas de las proteínas identificadas por alguno de estos sistemas y que considerábamos que eran los mejores candidatos como reguladores o efectores de Rab18. Para hacer dicha selección, nos hemos servido de una estrategia traslacional, analizando las posibles correlaciones de expresión entre Rab18 y nuestros candidatos en muestras de feocromocitomas. Este tipo de aproximación nos ha permitido además ampliar nuestro conocimiento sobre la relación de Rab18 con patologías (neuro)endocrinas, que habíamos estudiado con anterioridad en somatotropinomas hipofisarios humanos (Vazquez-Martinez *et al.*, 2008).

5.1.- Regulación de la actividad de Rab18

Para poder disponer de una visión integrada de la función que ejerce Rab18 sobre los gránulos de secreción, primero necesitamos entender las etapas secuenciales que dan lugar a la producción de una GTPasa funcional y activa: prenilación e intercambio de GDP por GTP.

Como se ha mencionado en la Introducción, las proteínas Rab se sintetizan inicialmente como proteínas solubles en el citosol, donde son reconocidas por una proteína de tipo chaperona denominada REP (*Rab escort protein*) (Alexandrov *et al.*, 1994). La REP presenta la proteína Rab a la RabGGT (*Rab geranylgeranyl transferase*) para la adición de grupos geranylgeranilo. Estos grupos de tipo prenilo son añadidos mediante puentes tioéter covalentes a residuos de cisteína localizados en el extremo carboxilo terminal de la proteína Rab (Anant *et al.*, 1998). Esta modificación post-traducciona es necesaria para permitir que las proteínas Rab se anclen a las bicapas lipídicas del orgánulo diana. Sin embargo, la actividad de la RabGGT debe estar espacial y temporalmente coordinada con la ruta biosintética del mevalonato/colesterol. Una de las enzimas claves de esta ruta es la farnesil bifosfato sintasa (FDS) que cataliza la producción de geranyl-pirofosfato y farnesil-pirofosfato a partir de isopentenil-pirofosfato y dimetilalil-pirofosfato, respectivamente. El producto resultante, el farnesil-pirofosfato, es un intermediario clave para la biosíntesis de colesterol y de esteroides, y puede actuar como ligando o agonista de ciertos receptores de hormonas y factores de crecimiento (Russell, 2011). Además, el farnesil-pirofosfato es el sustrato de la geranylgeranyl bifosfato sintasa (GGDS), enzima que cataliza la producción de grupos geranylgeranilo que serán utilizados subsecuentemente por la RabGGT para la modificación post-traducciona de las proteínas Rab. En la Figura 42, se muestran las reacciones enzimáticas que tienen

lugar en la ruta del mevalonato y las enzimas participantes en cada etapa.

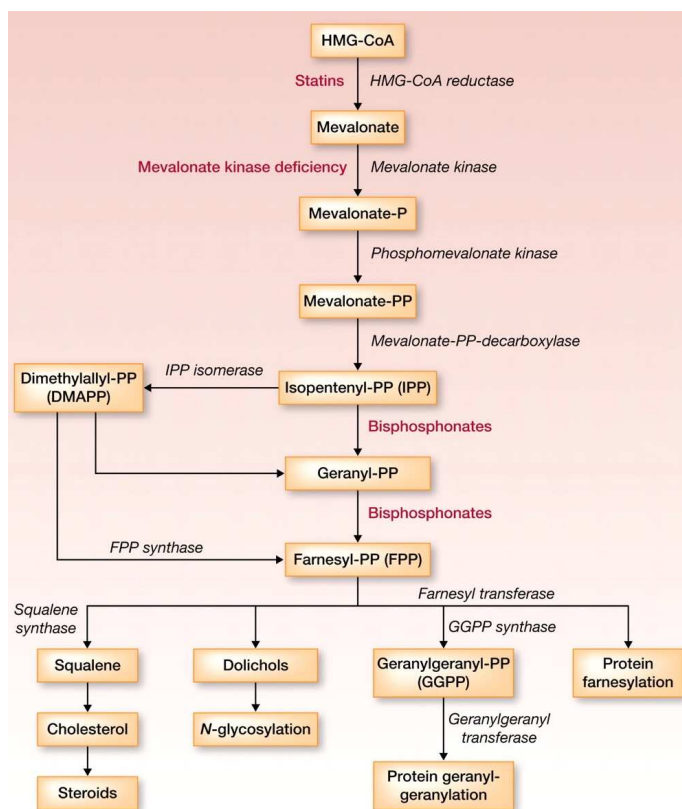


Figura 42: Ruta biosintética del mevalonato/colesterol. Se nombran las enzimas y las reacciones enzimáticas que catalizan, así como los compuestos que afectan a la ruta y las enfermedades asociadas a ella.

Los experimentos de cromatografía líquida que se han realizado en este estudio apuntan a que Rab18 forma complejo con la enzima FDS. Esto implicaría que la conversión de farnesil-pirofosfato a geranylgeranyl-pirofosfato ocurre en un complejo heterodimérico

formado por las dos enzimas (FDS y GGDS). De hecho, en la levadura de fisión *Saccharomyces pombe* se ha demostrado mediante Y2H y co-inmunoprecipitación que, efectivamente, FDS y GGDS interaccionan físicamente formando un heterodímero con doble actividad enzimática (Ye *et al.*, 2007). A este complejo se uniría la enzima encargada de transferir el grupo geranylgeranilo a la proteína Rab, la RabGGT, que a su vez tiene gran afinidad por proteínas Rab no preniladas que van acompañadas de REP.

Tras el proceso de prenilación, las proteínas Rab pierden afinidad por REP, que sólo se une a proteínas Rab no preniladas (Goody *et al.*, 2005), y éstas pueden entonces comenzar sus ciclos de actividad que dependen de la unión de GDP o GTP a la molécula (Pfeffer, 2005; Pfeffer y Aivazian, 2004; Seabra y Wasmeier, 2004). Sin embargo, en cuanto quedan libres de REP, las proteínas Rab son secuestradas por proteínas GDI (*GDP dissociation inhibitor*), que presentan gran afinidad por las proteínas Rab cuando éstas están preniladas y en su estado GDP, impidiendo el intercambio de GDP por GTP y, por tanto, reteniéndolas en el citosol en su conformación inactiva (Alory y Balch, 2001). En roedores y humanos se han descrito

hasta el momento dos isoformas de GDI: GDI1 (GDI α), que se expresa abundantemente en tejido nervioso pero mucho menos en otros tejidos, y GDI2 (GDI β), que se expresa de manera ubicua (Alory y Balch, 2001; Nishimura *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1994). Nuestros resultados de inmunoprecipitación indican que Rab18 interacciona específicamente con GDI2 en células PC12. Así pues, podemos proponer que tras su prenilación, Rab18 es mantenida en su conformación inactiva soluble en el citosol gracias a su unión con GDI2, lo que hace de esta última proteína un importante regulador de la capacidad secretora de células (neuro)endocrinas. De acuerdo con esto, el seguimiento de gránulos de secreción que contienen NPY-GFP en células PC12 mediante video-microscopía mostró que la sobreexpresión de GDI2 provoca un aumento en la velocidad media con la que se mueven los gránulos. Este efecto puede deberse a que una mayor cantidad de Rab18 permanece secuestrada en el citosol en su forma inactiva y, por tanto, no puede ejercer su función inhibitoria sobre el movimiento de gránulos hacia la membrana plasmática en respuesta a estímulos extracelulares. No obstante, no podemos excluir que el efecto estimulador de la sobreexpresión de GDI2 sobre el movimiento de gránulos de secreción en células PC12 sea debido a su efecto sobre otras proteínas Rab, distintas de Rab18, relacionadas con el control del tráfico de gránulos. Este podría ser el caso de distintas isoformas de Rab3 que, de hecho, se asocian a gránulos de secreción en células PC12 y regulan su movimiento a diferentes niveles (Fischer von Mollard *et al.*, 1991; Johannes *et al.*, 1998; Johannes *et al.*, 1994; Vazquez-Martinez *et al.*, 2007).

Dada la alta afinidad de las proteínas GDI por las formas Rab-GDP preniladas (K_d en el rango nanomolar) y, consecuentemente, la baja tasa de disociación intrínseca de GDI, deben existir mecanismos activos que favorezcan este proceso para que las proteínas Rab puedan intercambiar GDP por GTP y activarse. Se han propuesto dos mecanismos que pueden facilitar la separación del complejo Rab-GDP:GDI. En el primero, se propone la existencia de proteínas GDF (*GDI displacement factor*), como la proteína de levaduras Yip3, que media la disociación de Rab9-GDP:GDI y facilita la inserción de Rab9 en su membrana diana (Sivars *et al.*, 2003). Sin embargo, es muy probable que este mecanismo no sea general, puesto que Yip3 es el único GDF que se ha identificado hasta el momento. El segundo mecanismo implica la participación de una GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) que, al mediar el intercambio de GDP

por GTP en la proteína Rab, hace que la proteína GDI pierda rápidamente su afinidad por Rab-GTP y que ésta pueda anclarse a la membrana diana. Así, se ha demostrado que el dominio GEF de la proteína de *Legionella* DrrA es suficiente para desplazar GDI del complejo Rab1-GDP:GDI al catalizar el intercambio de nucleótidos de GDP a GTP (Schoebel *et al.*, 2009). No obstante, la obtención de la estructura cristalográfica de varios complejos Rab-GEF y Rab-GDI han puesto en duda este mecanismo, ya que han mostrado que las proteínas con actividad GEF y las GDIs se unen a sitios comunes en la secuencia de las proteínas Rab y, por tanto, tendrían que competir para su unión a las GTPasas (Rak *et al.*, 2003; Schoebel *et al.*, 2009). Recientemente, se ha propuesto un tercer mecanismo que explicaría, al menos en parte, cómo las proteínas Rab pueden ser activadas y dirigidas a sus respectivas membranas diana. Se trata de la regulación de la actividad de las GTPasas Rab mediante modificaciones post-traduccionales. Ya en la década de los 90 se había postulado que la fosforilación de ciertas proteínas Rab (Rab1A, Rab4 y Rab6) podía afectar a la distribución citosol/membrana de estas GTPasas (Bailly *et al.*, 1991; van der Sluijs *et al.*, 1992; Worby y McGouran, 1999), pero el hecho de que existen otras proteínas Rab que no son fosforiladas condujo a pensar que este mecanismo regulador no era general. Recientemente, dos grupos han descubierto de manera independiente que ciertas proteínas de *Legionella*, AnkX y DrrA, son capaces de desplazar GDI de Rab1B-GDP y Rab35-GDP gracias a su capacidad de fosfocolinación y AMPilación reversible de las GTPasas en los residuos Ser76 y Tyr77, respectivamente (Mukherjee *et al.*, 2011; Oesterlin *et al.*, 2012). Estos residuos están altamente conservados en las proteínas Rab, incluida Rab18, por lo que se propone que este mecanismo puede ser utilizado también por las células para desplazar GDI de Rab-GDP en condiciones no patológicas (Oesterlin *et al.*, 2012).

Curiosamente, en este trabajo hemos demostrado mediante inmunocolocalización y FRET que Rab18 interacciona con HTT en su conformación inactiva y que dicha asociación se debilita tras la estimulación de la ruta de secreción en células PC12. Además, nuestros estudios de sobreexpresión han mostrado que la cantidad de HTT presente en estas células puede modificar la proporción de Rab18 asociada a membrana con respecto a la citosólica. Concretamente, la cantidad de Rab18 capaz de unirse a la superficie de gránulos de secreción aumentó en células PC12 que sobreexpresaban HTT, lo que sugiere que esta proteína facilita, directa o indirectamente, la activación de la GTPasa y, por tanto, su anclaje a la membrana

diana. De acuerdo con esta idea, se ha demostrado que HTT interacciona con Rab11 y que en células madre embrionarias carentes de HTT, tanto la capacidad de intercambio de GDP por GTP en esta GTPasa como la de su asociación a membranas están seriamente comprometidas (Li *et al.*, 2008). De hecho, muchas de las disfunciones celulares asociadas a la enfermedad de Huntington son atribuidas a una pérdida de la actividad de Rab11 (Li *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010; Richards *et al.*, 2011; Steinert *et al.*, 2012). Más aún, la HTT mutada perturba el tráfico de vesículas post-Golgi hacia el compartimento lisosomal debido a que el complejo Rab8/optineurin es incapaz de unirse a su membrana diana (del Toro *et al.*, 2009). En conjunto, todos estos resultados podrían indicar que HTT tiene actividad GEF para diversas proteínas Rab, ya que facilita su activación y, como consecuencia, su presencia en membrana. Sin embargo, un análisis detallado de la secuencia aminoacídica de HTT sugiere otra posibilidad. HTT, al igual que ocurre con una proteína que interacciona con ella, HypE (Worby *et al.*, 2009), presenta un dominio de tipo Fic. Este dominio es el responsable de conferir actividad de AMPilación a la proteína de *Legionella* AnkX (Roy y Mukherjee, 2009). Así pues, es posible que HTT facilite el intercambio de GDP por GTP en Rab18 y su presencia en membrana debido a su capacidad de AMPilar de manera reversible esta GTPasa, lo que, a su vez, provocaría el desplazamiento de GDI2 del complejo Rab18-GDP, quedando esta última libre para su asociación con una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina.

Si esta hipótesis es cierta y HTT modula la actividad de Rab18 mediante modificaciones post-traduccionales de la GTPasa en lugar de actuar como GEF y facilitar el intercambio de GDP por GTP, la proteína GEF encargada de mediar este proceso en Rab18 estaría aún por descubrir. En este sentido, el análisis del interactoma de Rab18 mediante Y2H ha resultado en la identificación de dos proteínas con actividad GEF que podrían mediar el intercambio de nucleótidos de guanina en Rab18: ARHGEF3 y RASGEF1B. Se ha descrito que ARHGEF3 activa de manera específica dos GTPasas implicadas en la remodelación del citoesqueleto de actina, RhoA y RhoB (Arthur *et al.*, 2002), mientras que RASGEF1B parece activar específicamente Rap2, una GTPasa que regula la adhesión celular dependiente de integrinas y cadherinas, así como la diferenciación neuronal y la plasticidad sináptica (Yaman *et al.*, 2009). En este sentido, no disponemos de evidencias experimentales directas que demuestren que ARHGEF3 y RASGEF1B puedan actuar como GEFs de

Rab18 o de otras proteínas Rab, aunque sí cabe mencionar que existen ejemplos de proteínas con actividad GEF que tienen múltiples dianas entre las GTPasas de diferentes familias. Por ejemplo, RhoGEF Trio es capaz de intercambiar GTP no sólo en RhoA y RhoG, sino también en Rac1 (van Rijssel y van Buul, 2012).

Otra posibilidad es que ARHGEF3 y RASGEF1B sean efectores de Rab18. En este sentido, Rab18 podría regular la actividad de estas proteínas GEF mediante una interacción directa. De hecho, el modo de actuación en cascada de las proteínas Rab se basa en muchas ocasiones en interacciones de proteínas Rab activas con GEFs de otras GTPasas. El aumento de la cantidad de la segunda GTPasa en la membrana diana suele conllevar la activación de una proteína GAP que acelera la hidrólisis de GTP en la primera GTPasa y, por tanto, su inactivación y extracción de la membrana. De esta manera, las células aseguran la unidireccionalidad de la ruta secretora. El grupo de P. Novick fue el primero en aportar pruebas experimentales que apoyan este mecanismo. En concreto, descubrieron que la GTPasa de levaduras Ypt32p recluta a la proteína GEF que activa la siguiente GTPasa de la ruta, Sec4p (Ortiz *et al.*, 2002). Además, Ypt32p también recluta la proteína GAP encargada de inactivar la GTPasa previa, Ypt1p (Rivera-Molina y Novick, 2009). Otros grupos han propuesto modelos de actuación similares para otras Rab GTPasas (Nottingham *et al.*, 2011; Nottingham y Pfeffer, 2009; Nottingham *et al.*, 2012; Rink *et al.*, 2005), lo que sugiere que las cascadas de proteínas Rab pueden representar el mecanismo molecular general que usa la célula para establecer el orden secuencial de activación y coordinación de los distintos compartimentos de la ruta secretora. En lo referente a Rab18, se requiere trabajo adicional para elucidar el papel fisiológico de su interacción con ARHGEF3 y RASGEF1B.

5.2.- Acción de Rab18 sobre el complejo motor dependiente de microtúbulos.

En trabajos previos, demostramos que Rab18-GTP se asocia a una población particular de gránulos de secreción en células (neuro)endocrinas, lo que provoca una inhibición de su capacidad de movimiento anterógrado y, como consecuencia, una disminución de la tasa de secreción neta de dichas células en respuesta a estímulos extracelulares (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). También demostramos que el compartimento secretor positivo para Rab18 es diferente al que controla Rab3A, otra Rab GTPasa que regula exocitosis en las últimas etapas del proceso: *docking* y fusión de gránulos de secreción con la membrana plasmática (Martelli *et al.*, 2000; Schluter

et al., 2002). Estas observaciones, junto al análisis ultraestructural de la población de gránulos de secreción positivos para Rab18 que reveló que estos se encuentran a cierta distancia de la membrana plasmática, nos condujo a proponer que Rab18 actúa en etapas tempranas del proceso secretor (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). Durante esas etapas, los péptidos de secreción se clasifican y empaquetan en gránulos de nueva formación que se anclan a la red de microtúbulos para su transporte a larga distancia hacia zonas concretas de la membrana especializadas en secreción (Alexander *et al.*, 2005; Rudolf *et al.*, 2001). Cuando los gránulos se encuentran próximos a la membrana plasmática, son traspasados a filamentos de actina, que controlan de manera muy precisa su acercamiento final (Atkinson *et al.*, 1992; Goldstein y Yang, 2000; Park y Loh, 2008; Sheetz, 1999; Vaughan y Dean, 2006). De acuerdo a la posición de los gránulos que presentan Rab18 relativa a la superficie celular, cabe pensar que su transporte debe depender de la red de microtúbulos más que de filamentos de actina. De hecho, nuestros resultados muestran que el mutante constitutivamente activo Rab18(Q67L) marca estructuras vesiculares que no coinciden espacialmente con filamentos de actina en células PC12, donde esta red se localiza principalmente cerca de la membrana plasmática formando el córtex celular. Por el contrario, estas vesículas se localizan muy próximas a haces de microtúbulos, como demuestra el alto grado de coincidencia espacial entre los gránulos que presentan Rab18(Q67L) y tubulina. Nuestros estudios de video-microscopía confirman esta asociación, ya que nos permitieron observar claramente como los gránulos marcados con DsRed-Rab18(Q67L) alternan movimientos anterógrados y retrógrados en estrecha asociación con los haces de microtúbulos. Más aún, en este trabajo hemos mostrado que se requiere una red funcional de microtúbulos para que se produzca la asociación de Rab18 a los gránulos ya que ni la forma silvestre de Rab18 tras un pulso despolarizante con K^+ ni incluso la forma constitutivamente activa incapaz de hidrolizar GTP pueden asociarse a gránulos cuando los microtúbulos se encuentran despolimerizados mediante el uso de nocodazol. Las proteínas Rab no interaccionan directamente con microtúbulos, por lo que estos resultados sugerían que el reclutamiento de Rab18 debía estar supeditado a la presencia en la superficie del gránulo de secreción de proteínas que sí lo hagan.

En este sentido, los motores moleculares dependientes de microtúbulos, quinesina y dineína, cumplen perfectamente esta condición. Por una parte, reconocen y se asocian de manera específica al cargo (en este caso, los gránulos de secreción) y, por

otra, son los responsables del movimiento dirigido sobre los haces de microtúbulos (Karcher *et al.*, 2002). Nuestros estudios de FRET en células fijadas y en células vivas en tiempo real han mostrado que la estimulación de la ruta de secreción regulada induce un aumento en la asociación de Rab18 con la cadena ligera de la quinesina-1 (KLC) en células PC12, con la que, además, se observa colocalización en los estudios de microscopía confocal. Además, uno de los clones positivos obtenidos mediante Y2H fue KIF5C, una isoforma de cadena pesada de quinesina-1 (KHC) que forma homodímeros así como heterodímeros con KIF5A y KIF5B (Hirokawa *et al.*, 2010). Así pues, es razonable proponer la incorporación de quinesina-1 a la superficie de los gránulos de secreción y su interacción con Rab18 podría estabilizar la GTPasa en su forma activa y de esta manera evitar que proteínas GAP medien la hidrólisis de GTP y, con ello, la extracción de Rab18 de la membrana del gránulo. En ausencia de una red de microtúbulos funcional, la quinesina-1 adoptaría una conformación autoinhibidora en la que los dominios globulares de las KHCs, responsables de la unión de la proteína motora a los microtúbulos, estarían plegados y asociados a las KLCs de tal manera que se impediría el reconocimiento y la unión al *cargo* (Cai *et al.*, 2007).

Las quinesinas-1 formadas por cualquier combinación de KHCs pueden transportar diversos tipos de cargo, entre los cuales se encuentran diferentes vesículas de la ruta secretora (Hirokawa *et al.*, 2010). Además, estas proteínas parecen actuar coordinadas con la dineína, ya que, en muchas ocasiones, las vesículas se mueven bidireccionalmente, es decir, excursiones en una dirección pueden ser interrumpidas por pausas o movimientos en la dirección opuesta, lo que ha sugerido la presencia de ambos motores en la superficie de la misma vesícula (Caviston y Holzbaur, 2006). Los mecanismos reguladores que gobiernan la coordinación de ambos motores se desconocen, pero se propone que ésta puede ocurrir a través de la interacción directa de los motores con factores accesorios como la dinactina (Deacon *et al.*, 2003). De acuerdo con esto, nuestros estudios de microscopía confocal mostraron que los gránulos positivos para Rab18 presentan a menudo p150^{Glued}, una subunidad del complejo motor dinactina (Schroer, 2004). Por otra parte, se ha propuesto que el estado de fosforilación de HTT determina la asociación de quinesina-1 o dineína a la superficie de la vesícula a transportar (Colin *et al.*, 2008). Concretamente, cuando se encuentra fosforilada en el residuo de Ser421, HTT promueve la unión de quinesina-1 a los microtúbulos y al cargo y, consecuentemente, el transporte anterógrado de estos.

Por el contrario, cuando HTT no está fosforilada, la quinesina-1 se descuelga del complejo motor y entonces las vesículas se mueven en dirección retrógrada (Colin *et al.*, 2008). Estos resultados, junto a los nuestros, sugieren que HTT actúa no sólo como centro coordinador del ensamblado del complejo motor encargado de transportar cargo hacia el extremo (+) de microtúbulos, sino también como regulador indirecto de su actividad, ya que media el reclutamiento de Rab18 lo que, por su parte, provoca una disminución de la capacidad de movimiento anterógrado.

Nuestros experimentos de video-microscopía en los que se han analizado distintos parámetros del movimiento de vesículas mediado por quinesina-1 han mostrado que, en células que sobreexpresan Rab18, se produce una reducción significativa de la velocidad de movimiento anterógrado de dichas vesículas tras la estimulación de la ruta de secreción regulada. Estos datos, junto con los obtenidos mediante FRET y Y2H, sugieren que la interacción de Rab18 con quinesina-1 inhibe la procesividad de la proteína motora. En la literatura se pueden encontrar numerosos ejemplos de proteínas Rab que interaccionan, directa o indirectamente, con proteínas motoras para regular el transporte entre el compartimento donador y el aceptor. Este papel de las proteínas Rab en la regulación del transporte a lo largo del citoesqueleto se ha demostrado claramente en estudios realizados con la proteína motora de asociación a actina miosina-Va, que es reclutada específicamente hacia melanosomas gracias a la acción de Rab27A en complejo con diversas proteínas efectoras (Kuroda *et al.*, 2005; Tsuboi y Fukuda, 2005, 2006). Otros estudios han mostrado la interacción de diferentes proteínas Rab con los motores moleculares asociados a microtúbulos. Por ejemplo, Rab6, formando complejo con BICD1/2, se asocia a dineína y media el transporte retrógrado de vesículas entre el TGN y el RE; Rab7, junto con su efector RILP, recluta dineína y dinactina a los lisosomas; Rab4 media el transporte de endosomas tempranos mediante su interacción directa con la quinesina-14B (Caviston y Holzbaur, 2006), y Rab11 interacciona con quinesina-1, lo que permite su transporte desde el soma a la base de las espinas dendríticas en neuronas (Matsuzaki *et al.*, 2011). Sin embargo, a nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se demuestra no sólo la interacción directa de Rab18 con quinesina-1, sino también que una proteína Rab puede modular negativamente la capacidad de movimiento de una proteína motora mediante su interacción con ella.

5.3.- Interacción de Rab18 con gránulos de secreción inmaduros en las etapas tempranas de la ruta de secreción regulada.

Durante las etapas tempranas de la ruta secretora regulada, los péptidos de secreción sufren una clasificación y empaquetado en gránulos que se forman a partir de membranas del TGN [modelo de *sorting-for-entry*; (Chung *et al.*, 1989; Cool *et al.*, 1997)]. Este modelo clásico está basado en la presunción de que el TGN actúa como centro primario de clasificación de proteínas, cuyo destino final puede ser la membrana plasmática (secreción regulada o constitutiva) o lisosomas. En este escenario, el empaquetamiento de los gránulos de secreción electrodensos (*dense-core granules*; DCGs) ocurriría gracias a la acción de receptores de clasificación presentes en las membranas del TGN que reconocerían específicamente las proteínas a empaquetar en los lugares donde se produce la evaginación de los gránulos de nueva formación (Chung *et al.*, 1989; Cool *et al.*, 1997), como se ha propuesto que sucede para la carboxipeptidasa E, que actuaría de receptor del precursor POMC y de otras hormonas hipofisarias (Cool *et al.*, 1997). En este contexto, los gránulos de secreción así formados contendrían una carga homogénea compuesta exclusivamente por péptidos de secreción listos para ser dirigidos a la membrana plasmática y liberados en respuesta a estímulos extracelulares. Según este modelo de clasificación y transporte de proteínas de secreción, cabría preguntarse cuál podría ser el significado biológico de la retención de una población determinada de gránulos de secreción mediada por Rab18. Una posibilidad es que la célula necesite retener un determinado número de gránulos de nueva síntesis debido a que su contenido requiere un mayor procesamiento para que los péptidos de secreción adquieran actividad biológica antes de pasar a formar parte del *pool* de gránulos listos para ser liberados. De acuerdo con esto, muchas hormonas peptídicas se sintetizan inicialmente como precursores inactivos que, como se indicó en secciones anteriores, son procesados fundamentalmente en los gránulos de secreción (Seidah, 2011; Seidah y Prat, 2002). Es en estos orgánulos donde las prohormonas y las proteasas que las procesan interaccionan, generándose las formas bioactivas correspondientes que serán finalmente secretadas (Kim *et al.*, 2006). En concreto, la biogénesis de DCGs en células cromafines se describió por primera vez en 1941 (Bennett, 1941). En éste, y en estudios posteriores, se propuso que este proceso comienza con la evaginación de gránulos de secreción inmaduros (ISGs) a partir del TGN, los cuales necesitan pasar por varias etapas de maduración para formar gránulos de secreción maduros (MSGs).

Estas etapas incluyen la acidificación del interior de ISGs de nueva formación, un proceso necesario para la activación de las convertasas de prohormonas y carboxipeptidasas que participan en el procesamiento final de las proteínas de la ruta de secreción regulada, así como la extracción de enzimas hidrolasas lisosomales y proteínas de la ruta de secreción constitutiva empaquetadas erróneamente en ISGs (Arvan y Castle, 1992, 1998; Bennett, 1941; Orci *et al.*, 1986). Adicionalmente, se produce la pérdida de la cubierta de clatrina y de otras proteínas de cubierta de los gránulos, la extracción de H₂O y la condensación del contenido del gránulo para formar los MSGs (Arvan y Castle, 1992, 1998; Bennett, 1941; Orci *et al.*, 1986). En relación con estas observaciones, a principios de los años 90 se propuso un modelo alternativo de clasificación de proteínas en la ruta secretora (modelo de *sorting-by-retention*), según el cual los DCGs no se formarían de una manera activa a partir de la membrana del TGN, sino que se generarían a partir de proyecciones túbulo-vesiculares del TGN que, eventualmente, se separarían de la red y formarían ISGs (Rambourg *et al.*, 1992). Así pues, todas las proteínas, independientemente de su destino final, entrarían en ISGs y, una vez allí, aquellas proteínas destinadas a ser liberadas por la vía constitutiva o a ser transportadas a otros orgánulos serían extraídas mientras que las destinadas a ser liberadas por la vía regulada serían retenidas de manera selectiva en espera del estímulo apropiado que induzca su liberación (revisado en Kim *et al.*, 2006).

En los primeros estudios realizados en nuestro laboratorio sobre Rab18, que permitieron demostrar la asociación de esta GTPasa a una subpoblación de gránulos de secreción en tres tipos celulares con ruta de secreción regulada, *i.e.*, las células PC12, la línea corticotropa AtT20, y las células melanotropas hipofisarias, no obtuvimos pruebas experimentales sólidas que nos permitieran establecer la naturaleza exacta de dichos gránulos (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007). No obstante, ya entonces sugerimos que Rab18 actuaría en fases tempranas del tráfico de gránulos, basándonos en la observación de que los gránulos Rab18-positivos se localizaban a una distancia considerable en relación a la superficie celular (aproximadamente de 650-700 nm), además de no colocalizar con otra proteína Rab que marca los gránulos en estado de docking, Rab3A (Martelli *et al.*, 2000; Schluter *et al.*, 2002). En el presente estudio, comenzamos a plantearnos la posibilidad de que los gránulos marcados con Rab18 pudieran corresponder a una subpoblación funcional particular a partir de los resultados derivados del estudio de Y2H. En concreto, estos ensayos

permitieron la identificación de varias proteínas relacionadas con el sistema de endosomas/lisosomas, como algunos componentes del complejo BLOC-1 (*pallidin* y probablemente DBNDD2) o LAMP1, lo que, en principio, podría sugerir la existencia de una relación funcional entre estos orgánulos y los gránulos de secreción mediada por Rab18. En este contexto, los ISGs están relacionados con el sistema endolisosomal ya que transfieren parte de su contenido, mediante la gemación de vesículas recubiertas de clatrina, a orgánulos de dicho sistema (Braulke y Bonifacino, 2009). Por ello, nos planteamos analizar si, tras su activación, Rab18 se asocia a esta población concreta de gránulos de secreción inmaduros y, para ello, comparamos la distribución intracelular de Rab18 con la que exhibe un marcador de ISGs, la proteína de superficie sinaptotagmina IV (Eaton *et al.*, 2000). Las imágenes de microscopía confocal y el cálculo posterior del índice de colocalización de las señales de Rab18 y sinaptotagmina IV indican que la estimulación de la ruta secretora provoca la asociación de la GTPasa a ISGs. Estas observaciones, junto con el demostrado papel de Rab18 en la regulación de la secreción en células neuroendocrinas, sugería una posible implicación de dicha proteína, directa o indirecta, en la maduración del cargo contenido en los gránulos y a ser secretado por estas células.

Los experimentos de colocalización de Rab18 y las proteínas identificadas por Y2H pueden ayudar a proponer un modelo de actuación de Rab18 en relación a los ISGs. Así, estos experimentos mostraron que Rab18, cuando está asociado a vesículas, colocaliza con proteínas del complejo BLOC-1 (*pallidin* y DBNDD2, , si esta proteína puede asimilarse en cuanto a función a su parálogo *dysbindin*; ver comentarios más adelante), así como con una proteína de la familia de las dinaminas (DNM3). BLOC-1 es un complejo multiproteico compuesto por 8 subunidades, 5 de las cuales (*pallidin*, *muted*, *cappuccino*, *dysbindin* y BLOS3) se han asociado con el síndrome de Hermansky-Pudlak, un desorden autosómico recesivo que afecta a la biogénesis de orgánulos relacionados con lisosomas y caracterizado por la aparición de albinismo de piel, ojos y pelo, sangrado continuado y fibrosis pulmonar (Bonifacino, 2004). Existen evidencias experimentales que demuestran una interacción directa de componentes del complejo BLOC-1 con subunidades del complejo adaptador AP-3 (Di Pietro *et al.*, 2006), un componente de la maquinaria celular que controla la clasificación y transporte de proteínas específicas desde endosomas hacia lisosomas y a otros orgánulos especializados como los melanosomas (Setty *et al.*, 2007) o vesículas sinápticas (Newell-Litwa *et al.*, 2009). Estos complejos

adaptadores son reclutados a sus membranas dianas gracias a la acción de proteínas Ras GTPasas de bajo peso molecular y fosfolípidos de inositol (Bonifacino y Glick, 2004). En el caso concreto de AP-3, el complejo es reclutado hacia la membrana de endosomas por la GTPasa Arf unida a GTP (Faundez *et al.*, 1998; Ooi *et al.*, 1998). Curiosamente, se ha demostrado que la asociación del complejo BLOC-1 a su membrana diana aumenta tras el tratamiento de las células con el análogo de GTP no hidrolizable GTP γ S, lo que sugiere que, al igual que sucede con AP-3, el reclutamiento de BLOC-1 a membrana también depende de la actividad de una GTPasa (Di Pietro *et al.*, 2006). Dada la interacción de Rab18 con varias subunidades del complejo BLOC-1, cabría la posibilidad de que esta GTPasa actúe como punto de ensamblaje de BLOC-1 en la membrana de ISGs. De acuerdo con esta idea, se ha propuesto que BLOC-1 participa en distintas etapas de la ruta secretora y la fusión de membranas puesto que muchas de sus subunidades interaccionan directa o indirectamente con moléculas clave que regulan estos procesos, tales como proteínas Rab (Cheli *et al.*, 2010), SNAREs (Ghiani *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2009), *Sec1/Munc18-like* (Hikita *et al.*, 2009) y subunidades de factores de *tethering* como el exocisto (Bao *et al.*, 2008; Mead *et al.*, 2010; Rodriguez-Fernandez y Dell'Angelica, 2009). Así pues, teniendo en cuenta nuestros resultados, nos planteamos proponer que, tras su activación, Rab18 podría ayudar a reclutar al complejo BLOC-1/AP-3 a la superficie de los ISGs para que se lleve a cabo la clasificación del *cargo*, la formación de vesículas con carga lisosomal y la transición de ISGs a MSGs que contengan una carga homogénea en productos de secreción regulada y, por tanto, listos para ser liberados en respuesta a estímulos extracelulares.

La interacción de Rab18 con DNM3 también apoya esta idea. DNM3 pertenece a una familia de GTPasas que participan en el proceso de escisión de las vesículas en formación de la membrana del compartimento donador (Ferguson y De Camilli, 2012). Aunque la función de estas proteínas ha sido investigada de manera exhaustiva en relación al proceso de endocitosis (Ferguson y De Camilli, 2012), varias aproximaciones experimentales han aportado evidencias que sugieren que las dinaminas también contribuyen a la fisión de vesículas recubiertas de clatrina en otros puntos de la ruta secretora, como en la evaginación de vesículas de transporte a partir de la red *trans* del Golgi y de endosomas (Derivery *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 1998; Kreitzer *et al.*, 2000; Mesaki *et al.*, 2011). En este escenario, Rab18 podría participar

en el proceso de maduración de ISGs no sólo reteniendo a estas vesículas en una posición concreta inhibiendo la procesividad del motor quinesina-1, sino también atrayendo a complejos moleculares responsables de la extracción de proteínas no destinadas a la ruta de secreción regulada de estos compartimentos, como BLOC-1/AP-3, así como reclutando un factor clave para la escisión de las vesículas de nueva formación del compartimento donador, la DNM3.

Las propuestas planteadas a partir de los resultados de YSH y de colocalización requieren, no obstante, tanto de pruebas bioquímicas adicionales de interacción proteína-proteína, como de experimentos funcionales que demuestren la repercusión del silenciamiento y/o sobreexpresión de Rab18 sobre el contenido de ISGs y MSGs, así como de los productos de secreción liberados bajo estas condiciones, que están actualmente en curso en nuestro laboratorio. En este contexto, indicar finalmente que se ha sugerido que la maduración de ISGs a MSGs en células AtT20 así como su capacidad de respuesta a secretagogos requieren la eliminación de un inhibidor putativo. Concretamente, la transición de ISGs a MSGs conlleva un aumento de la capacidad de respuesta exocítica de estos últimos al Ca^{2+} , lo que implica que durante las etapas de maduración se elimina un inhibidor de la exocitosis inducida por Ca^{2+} presente en los ISGs (Eaton *et al.*, 2000). De hecho, en estudios previos demostramos que la sobreexpresión de Rab18 provoca una reducción significativa en la capacidad secretora de células PC12 y AtT20 en respuesta a estímulos exocíticos (Vazquez-Martinez *et al.*, 2007) y en este hemos mostrado que la GTPasa inhibe el movimiento de los gránulos hacia la membrana plasmática mediante la regulación de la procesividad del motor molecular quinesina-1, por lo que es razonable proponer que la presencia de Rab18 en la superficie de ISGs puede impedir la transición de estos a MSGs.

5.4.- Rab18 y proteínas relacionadas en feocromocitomas

Como se ha descrito en la Introducción, en un estudio previo demostramos que la elevada secreción de hormona del crecimiento que tiene lugar en pacientes con tumores hipofisarios del tipo acromegalia está asociada a una expresión anormalmente reducida de Rab18 (Vazquez-Martinez *et al.*, 2008). En este trabajo, gracias a la colaboración establecida con los Dres. M. Robledo y A. De Cubas (CNIO), hemos ampliado estas observaciones a otro tipo de tumores neuroendocrinos, feocromocitomas y paragangliomas. Así, se ha podido demostrar que,

independientemente de la naturaleza del tumor (benignos o malignos esporádicos, o con mutaciones en la línea germinal de alguno de los siguientes genes: VHL, SDHB, SDHD, RET, NF1, TMEM127 o MAX), la expresión de Rab18 se encontró siempre por debajo de los niveles encontrados en la médula adrenal de individuos sanos, aunque sólo dispusimos de un número suficiente de muestras para obtener valores de FDR (*False Discovery Rate*) estadísticamente aceptables en el caso de tumores benignos. Teniendo en cuenta que los feocromocitomas están normalmente asociados con niveles circulantes elevados de catecolaminas y de sus metabolitos (Fung *et al.*, 2008) y de otros componentes de los gránulos de las células de la médula adrenal, incluidos ciertos péptidos derivados de las graninas (Guillemot *et al.*, 2006; Yon *et al.*, 2003), los niveles anormalmente reducidos de Rab18 en los tumores podrían contribuir a la secreción elevada de dichos productos, de forma adicional obviamente al efecto inherente a la neoplasia de las células cromafines. De hecho, en el caso de la acromegalia, hemos demostrado que las células somatotropas tumorales individuales muestran niveles de secreción de GH más elevados que los presentados por somatotropas procedentes de tumores no funcionantes, obtenidos a partir de pacientes con niveles plasmáticos normales o incluso disminuidos de GH (Vazquez-Martinez *et al.*, 2008). En conjunto, nuestros datos en tumores (neuro)endocrinos apuntan a que la expresión anormalmente reducida de Rab18 podría tener un efecto generalizado a nivel de la ruta de secreción regulada, y representar así un factor importante a considerar en aquellas enfermedades neuroendocrinas caracterizadas por la hipersecreción de determinados productos. Sin embargo, cabe mencionar que recientemente se ha demostrado que el micro síndrome de Warburg, una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva caracterizada por anormalidades en el desarrollo del cerebro, de los ojos y de distintos ejes endocrinos, está causada por una mutación en el gen de Rab18 que provoca la pérdida de actividad de la GTPasa (Bem *et al.*, 2011). A pesar de ello, estos pacientes no presentan mayor incidencia en la aparición tumores neuroendocrinos, lo que podría deberse a que deficiencias de larga duración en la función de Rab18 podrían suplirse por un aumento de la actividad de otra Rab GTPasa relacionada. De hecho, en este mismo estudio se mostró que mutaciones en el gen *RAB3GAP1*, que codifica una proteína GAP que regula la actividad de Rab3, provoca exactamente el mismo fenotipo que la mutación en el gen *RAB18*, lo que ha llevado a proponer que Rab18 y Rab3 pueden estar funcionalmente relacionados (Bem *et al.*, 2011).

En el estudio de *microarray*, también comparamos la expresión de distintas subunidades del complejo BLOC-1 (*cappuccino*, *muted*, *snapin* y *pallidin*), de DBNDD2, de DNM3 y de GDI2 en médula adrenal normal y en feocromocitomas. En cuanto a las subunidades del complejo BLOC-1, la expresión de *cappuccino*, *muted*, *snapin* y *pallidin* se encontraba reducida en muestras de feocromocitomas comparadas con tejido sano, aunque sólo se obtuvieron FDRs estadísticamente significativos para *cappuccino*. Por el contrario, la expresión de DBNDD2 se encontró consistentemente aumentada en todos los tipos de feocromocitomas analizados. Estos resultados indican, por una parte, una regulación diferencial aparente de la expresión de Rab18 y de los componentes del complejo BLOC-1. Por otra parte, señalan que DBNDD2, cuya regulación en los tumores es opuesta a la observada por los componentes del complejo BLOC-1, podría presentar funciones independientes de dicho complejo. De hecho, otro miembro de esta familia de proteínas, *dysbindin*, se identificó originalmente como una proteína de unión a *dystrobrevin*, una proteína que no forma parte del complejo BLOC-1 y que participa en el anclaje de la red de citoesqueleto a la matriz extracelular y sirve como *scaffold* para proteínas que participan en los sistemas de transducción de señal (Albrecht y Froehner, 2002; Blake *et al.*, 2002; Durbeej y Campbell, 2002). Curiosamente, la región aminoacídica responsable de su unión a *dystrobrevin* también contiene las regiones de unión a *pallidin*, por lo que la función de *dysbindin* en complejo con *dystrobrevin* no parece tener relación con la función del complejo BLOC-1 (Nazarian *et al.*, 2006). Será necesario realizar experimentos de caracterización de DBNDD2 en células neuroendocrinas para determinar su papel funcional en este tipo celular y su relación con Rab18 en este contexto. Por otra parte, la observación de que DBNDD2 y también DNM3 estén aumentados de manera significativa en un número importante de tumores, sugiere que estas dos proteínas podrían jugar un papel en la fisiopatología de los feocromocitomas.

Es importante resaltar también la correlación consistente encontrada entre la expresión de Rab18 y GDI2 en prácticamente todos los tipos de tumores, lo que está en línea con nuestros resultados de inmunoprecipitación y, en conjunto, apoyan la hipótesis de que, de las dos isoformas de GDI, que se han descrito hasta el momento (Alory y Balch, 2001; Nishimura *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 1994), GDI2 es la encargada de retener a Rab18 en su forma inactiva, al menos en células con ruta de secreción regulada. Finalmente, nuestros datos de correlación de la expresión de

Rab18 y LAMP1 en feocromocitomas, junto con la aparente común regulación transcripcional de ambas proteínas, y también del marcador de ISGs, sinaptotagmina IV, sugieren la existencia de un link funcional entre dichas proteínas, que estaría reforzada por nuestras observaciones de Y2H y de colocalización.

En el futuro nos planteamos analizar la expresión de Rab18 y de los interactores potenciales que hemos definido en nuestro estudio en relación a los niveles circulantes de catecolaminas y/o graninas de los pacientes en los que se llevaron a cabo los estudios de *microarrays*, lo que nos permitirá definir mejor la participación de dichas proteínas en la ruta de secreción regulada.

5.5.- Consideraciones finales

En resumen, de acuerdo a los resultados presentados en este trabajo, proponemos el siguiente modelo de actuación de Rab18 en el contexto de la ruta de secreción regulada en células neuroendocrinas. En condiciones basales, Rab18 se encontraría unida a GDP en su conformación inactiva y secuestrada en el citosol por GDI2, que evitaría la unión de GTP a la GTPasa y, por tanto, su activación prematura. Tras la estimulación de la ruta de secreción regulada, HTT favorecería la separación de Rab18 de GDI2 mediante modificaciones post-traduccionales y/o cambios conformacionales en la GTPasa que conllevarían la pérdida de afinidad de GDI2 por Rab18, permitiendo así el intercambio de GDP por GTP y la translocación de Rab18 hacia la superficie de ISGs. Una vez activa, Rab18 interaccionaría con el motor quinesina-1, inhibiendo su capacidad de movimiento y previniendo así el transporte de estos gránulos hacia la membrana plasmática y su incorporación al *pool* de gránulos de secreción listos para ser liberados. Esto permitiría a la célula disponer del tiempo suficiente para concluir con el procesamiento proteolítico de ciertos péptidos de secreción, así como para concluir con la clasificación del *cargo* contenido en ISGs y, por tanto, mediar la maduración de ISGs a MSGs. Rab18 podría también favorecer el reclutamiento a la superficie de ISGs de la maquinaria molecular responsable de la extracción de las enzimas hidrolíticas contenidas en ISGs o de otros productos no secretables y cuyo destino final sería el lisosoma o endosomas (BLOC-1, LAMP1, DNM3). En este proceso, Rab18 podría incluso transitar entre ISGs y lisosomas y endosomas, formando parte del establecimiento de una cascada particular de proteínas Rab que separe espacial y funcionalmente dichos compartimentos.

6.- CONCLUSIONES

- 1.- La asociación de Rab18 con los gránulos de secreción, que depende del citoesqueleto de microtúbulos, modula la dinámica de movilización de éstos.
- 2.- La unión de Rab18 a sus orgánulos diana depende presumiblemente de la acción de proteínas reguladoras como GDI2 y farnesil bifosfato sintasa, que controlarían la cantidad de proteína Rab18 activa.
- 3.- Rab18 en su conformación inactiva interacciona con huntingtina, lo que favorece su activación (i.e., intercambio de GDP por GTP) y asociación a la superficie de los gránulos de secreción.
- 4.- En su conformación activa, Rab18 interacciona con quinesina-1 y reduce la procesividad de este motor molecular.
- 5.- Mediante su interacción con los componentes del complejo motor asociados a microtúbulos, Rab18 podría regular la localización subcelular de los gránulos de secreción inmaduros y la relación funcional entre éstos y el sistema endo-lisosomal para facilitar la maduración de los mismos.
- 6.- La expresión de Rab18 y de algunos de sus reguladores y efectores está desregulada en tumores neuroendocrinos. Los cambios coordinados en la expresión de estas proteínas podrían contribuir, al menos en parte, al patrón de secreción alterado que caracteriza a este tipo de patologías.

7.- REFERENCIAS

- Adams M.E. (2006). Handbook of Biologically Active Peptides.
- Agarwal R., Jurisica I., Mills G.B. y Cheng K.W. (2009). The emerging role of the RAB25 small GTPase in cancer. *Traffic* **10**: 1561-1568.
- Ahras M., Otto G.P. y Tooze S.A. (2006). Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *J Cell Biol* **173**: 241-251.
- Albrecht D.E. y Froehner S.C. (2002). Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals* **11**: 123-129.
- Alexander K., Nikodemova M., Kucerova J. y Strbak V. (2005). Colchicine treatment differently affects releasable thyrotropin-releasing hormone (TRH) pools in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) and the median eminence (ME). *Cell Mol Neurobiol* **25**: 681-695.
- Alexandrov K., Horiuchi H., Steele-Mortimer O., Seabra M.C. y Zerial M. (1994). Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J* **13**: 5262-5273.
- Ali B.R., Wasmeier C., Lamoreux L., Strom M. y Seabra M.C. (2004). Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J Cell Sci* **117**: 6401-6412.
- Alory C. y Balch W.E. (2001). Organization of the Rab-GDI/CHM superfamily: the functional basis for choroideremia disease. *Traffic* **2**: 532-543.
- Amillet J.M., Ferbus D., Real F.X., Antony C., Muleris M., Gress T.M. y Goubin G. (2006). Characterization of human Rab20 overexpressed in exocrine pancreatic carcinoma. *Hum Pathol* **37**: 256-263.
- Anant J.S., Desnoyers L., Machius M., Demeler B., Hansen J.C., Westover K.D., Deisenhofer J. y Seabra M.C. (1998). Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex. *Biochemistry* **37**: 12559-12568.
- Andres D.A., Seabra M.C., Brown M.S., Armstrong S.A., Smeland T.E., Cremers F.P. y Goldstein J.L. (1993). cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* **73**: 1091-1099.
- Angers C.G. y Merz A.J. (2010). New links between vesicle coats and Rab-mediated vesicle targeting. *Semin Cell Dev Biol*.
- Appenzeller-Herzog C. y Hauri H.P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* **119**: 2173-2183.
- Arnautova I., Smith A.M., Coates L.C., Sharpe J.C., Dhanvantari S., Snell C.R., Birch N.P. y Loh Y.P. (2003). The prohormone processing enzyme PC3 is a lipid raft-associated transmembrane protein. *Biochemistry* **42**: 10445-10455.
- Arthur W.T., Ellerbroek S.M., Der C.J., Burridge K. y Wennerberg K. (2002). XPLN, a guanine nucleotide exchange factor for RhoA and RhoB, but not RhoC. *J Biol Chem* **277**: 42964-42972.
- Arvan P. y Castle D. (1992). Protein sorting and secretion granule formation in regulated secretory cells. *Trends Cell Biol* **2**: 327-331.
- Arvan P. y Castle D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J* **332** (Pt 3): 593-610.
- Arvan P., Kuliawat R., Prabakaran D., Zavacki A.M., Elahi D., Wang S. y Pilkey D. (1991). Protein discharge from immature secretory granules displays both regulated and constitutive characteristics. *J Biol Chem* **266**: 14171-14174.
- Assadi M., Sharpe J.C., Snell C. y Loh Y.P. (2004). The C-terminus of prohormone convertase 2 is sufficient and necessary for Raft association and sorting to the regulated secretory pathway. *Biochemistry* **43**: 7798-7807.
- Atkinson S.J., Doberstein S.K. y Pollard T.D. (1992). Moving off the beaten track. *Curr Biol* **2**: 326-328.
- Austin C., Hinners I. y Tooze S.A. (2000). Direct and GTP-dependent interaction of ADP-ribosylation factor 1 with clathrin adaptor protein AP-1 on immature secretory granules. *J Biol Chem* **275**: 21862-21869.

- Bailly E., McCaffrey M., Touchot N., Zahraoui A., Goud B. y Bornens M. (1991). Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34cdc2. *Nature* **350**: 715-718.
- Bao Y., Lopez J.A., James D.E. y Hunziker W. (2008). Snapin interacts with the Exo70 subunit of the exocyst and modulates GLUT4 trafficking. *J Biol Chem* **283**: 324-331.
- Barr F. y Lambright D.G. (2010). Rab GEFs and GAPs. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 461-470.
- Barr F.A. y Short B. (2003). Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 405-413.
- Baryshev M., Sargsyan E., Wallin G., Lejniaks A., Furudate S., Hishinuma A. y Mkrtchian S. (2004). Unfolded protein response is involved in the pathology of human congenital hypothyroid goiter and rat non-goitrous congenital hypothyroidism. *J Mol Endocrinol* **32**: 903-920.
- Bauerfeind R. y Huttner W.B. (1993). Biogenesis of constitutive secretory vesicles, secretory granules and synaptic vesicles. *Curr Opin Cell Biol* **5**: 628-635.
- Beinfeld M.C. (2003). Biosynthesis and processing of pro CCK: recent progress and future challenges. *Life Sci* **72**: 747-757.
- Bem D., Yoshimura S., Nunes-Bastos R., Bond F.C., Kurian M.A., Rahman F., Handley M.T., Hadzhiev Y., Masood I., Straatman-Iwanowska A.A., Cullinane A.R., McNeill A., Pasha S.S., Kirby G.A., Foster K., Ahmed Z., Morton J.E., Williams D., Graham J.M., Dobyns W.B., Burglen L., Ainsworth J.R., Gissen P., Muller F., Maher E.R., Barr F.A. y Aligianis I.A. (2011). Loss-of-function mutations in RAB18 cause Warburg micro syndrome. *Am J Hum Genet* **88**: 499-507.
- Bennett H.S. (1941). Cytological manifestations of secretion in the adrenal medulla of the cat. *Am J Anat* **69**: 333-381.
- Beuret N., Stettler H., Renold A., Rutishauser J. y Spiess M. (2004). Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J Biol Chem* **279**: 20242-20249.
- Bielli A., Thornqvist P.O., Hendrick A.G., Finn R., Fitzgerald K. y McCaffrey M.W. (2001). The small GTPase Rab4A interacts with the central region of cytoplasmic dynein light intermediate chain-1. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 1141-1153.
- Bishop L., Dimaline R., Blackmore C., Deavall D., Dockray G.J. y Varro A. (1998). Modulation of the cleavage of the gastrin precursor by prohormone phosphorylation. *Gastroenterology* **115**: 1154-1162.
- Blake D.J., Weir A., Newey S.E. y Davies K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* **82**: 291-329.
- Bonifacino J.S. (2004). Insights into the biogenesis of lysosome-related organelles from the study of the Hermansky-Pudlak syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **1038**: 103-114.
- Bonifacino J.S. y Glick B.S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**: 153-166.
- Bowman A.B., Kamal A., Ritchings B.W., Philp A.V., McGrail M., Gindhart J.G. y Goldstein L.S. (2000). Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein. *Cell* **103**: 583-594.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Braks J.A., Guldemond K.C., van Riel M.C., Coenen A.J. y Martens G.J. (1992). Structure and expression of Xenopus prohormone convertase PC2. *FEBS Lett* **305**: 45-50.
- Braks J.A. y Martens G.J. (1994). 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* **78**: 263-273.
- Braulke T. y Bonifacino J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 605-614.
- Brett C.L., Plemel R.L., Lobinger B.T., Vignali M., Fields S. y Merz A.J. (2008). Efficient termination of vacuolar Rab GTPase signaling requires coordinated action by a GAP and a protein kinase. *J Cell Biol* **182**: 1141-1151.

- Brett T.J. y Traub L.M. (2006). Molecular structures of coat and coat-associated proteins: function follows form. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 395-406.
- Browne C.A., Bennett H.P. y Solomon S. (1981). Isolation and characterization of corticotropin- and melanotropin-related peptides from the neurointermediary lobe of the rat pituitary by reversed-phase liquid chromatography. *Biochemistry* **20**: 4538-4546.
- Brumback A.C., Lieber J.L., Angleson J.K. y Betz W.J. (2004). Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods* **33**: 287-294.
- Bundgaard J.R., Vuust J. y Rehfeld J.F. (1995). Tyrosine O-sulfation promotes proteolytic processing of progastrin. *EMBO J* **14**: 3073-3079.
- Cai D., Hoppe A.D., Swanson J.A. y Verhey K.J. (2007). Kinesin-1 structural organization and conformational changes revealed by FRET stoichiometry in live cells. *J Cell Biol* **176**: 51-63.
- Cai H., Yu S., Menon S., Cai Y., Lazarova D., Fu C., Reinisch K., Hay J.C. y Ferro-Novick S. (2007). TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Nature* **445**: 941-944.
- Calero M. y Collins R.N. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Pra1p/Yip3p interacts with Yip1p and Rab proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 676-681.
- Calero M., Winand N.J. y Collins R.N. (2002). Identification of the novel proteins Yip4p and Yip5p as Rab GTPase interacting factors. *FEBS Lett* **515**: 89-98.
- Caviston J.P. y Holzbaur E.L. (2006). Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol* **16**: 530-537.
- Chanat E. y Huttner W.B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **115**: 1505-1519.
- Chavrier P., Gorvel J.P., Stelzer E., Simons K., Gruenberg J. y Zerial M. (1991). Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**: 769-772.
- Cheli V.T., Daniels R.W., Godoy R., Hoyle D.J., Kandachar V., Starcevic M., Martinez-Agosto J.A., Poole S., DiAntonio A., Lloyd V.K., Chang H.C., Krantz D.E. y Dell'Angelica E.C. (2010). Genetic modifiers of abnormal organelle biogenesis in a *Drosophila* model of BLOC-1 deficiency. *Hum Mol Genet* **19**: 861-878.
- 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., Gray J.W. y Mills G.B. (2004). The RAB25 small GTPase determines aggressiveness of ovarian and breast cancers. *Nat Med* **10**: 1251-1256.
- Chevet E., Cameron P.H., Pelletier M.F., Thomas D.Y. y Bergeron J.J. (2001). The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 120-124.
- Chung K.N., Walter P., Aponte G.W. y Moore H.P. (1989). Molecular sorting in the secretory pathway. *Science* **243**: 192-197.
- Cochilla A.J., Angleson J.K. y Betz W.J. (1999). Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. *Annu Rev Neurosci* **22**: 1-10.
- Cogli L., Piro F. y Bucci C. (2009). Rab7 and the CMT2B disease. *Biochem Soc Trans* **37**: 1027-1031.
- Colicelli J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* **2004**: RE13.
- Colin E., Zala D., Liot G., Rangone H., Borrell-Pages M., Li X.J., Saudou F. y Humbert S. (2008). Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J* **27**: 2124-2134.
- Cook N.R., Row P.E. y Davidson H.W. (2004). Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes. *Traffic* **5**: 685-699.
- Cool D.R. y Loh Y.P. (1994). Identification of a sorting signal for the regulated secretory pathway at the N-terminus of pro-opiomelanocortin. *Biochimie* **76**: 265-270.
- Cool D.R., Normant E., Shen F., Chen H.C., Pannell L., Zhang Y. y Loh Y.P. (1997). Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in *Cpe(fat)* mice. *Cell* **88**: 73-83.

- Courel M., Rodemer C., Nguyen S.T., Pance A., Jackson A.P., O'Connor D.T. y Taupenot L. (2006). Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *J Biol Chem* **281**: 38038-38051.
- Courel M., Soler-Jover A., Rodriguez-Flores J.L., Mahata S.K., Elias S., Montero-Hadjadje M., Anouar Y., Giulio R.J., O'Connor D.T. y Taupenot L. (2010). Pro-hormone secretogranin II regulates dense core secretory granule biogenesis in catecholaminergic cells. *J Biol Chem* **285**: 10030-10043.
- Cruz-Garcia D., Diaz-Ruiz A., Rabanal-Ruiz Y., Peinado J.R., Gracia-Navarro F., Castano J.P., Montero-Hadjadje M., Tonon M.C., Vaudry H., Anouar Y., Vazquez-Martinez R. y Malagon M.M. (2012). The Golgi-associated long coiled-coil protein NECC1 participates in the control of the regulated secretory pathway in PC12 cells. *Biochem J* **443**: 387-396.
- Cruz-Garcia D., Vazquez-Martinez R., Peinado J.R., Anouar Y., Tonon M.C., Vaudry H., Castano J.P. y Malagon M.M. (2007). Identification and characterization of two novel (neuro)endocrine long coiled-coil proteins. *FEBS Lett* **581**: 3149-3156.
- Culine S., Honore N., Tavittian A. y Olofsson B. (1992). Overexpression of the ras-related rab2 gene product in peripheral blood mononuclear cells from patients with hematological and solid neoplasms. *Cancer Res* **52**: 3083-3088.
- D'Adamo P., Menegon A., Lo Nigro C., Grasso M., Gulisano M., Tamanini F., Bienvenu T., Gedeon A.K., Oostra B., Wu S.K., Tandon A., Valtorta F., Balch W.E., Chelly J. y Toniolo D. (1998). Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet* **19**: 134-139.
- Dacks J.B. y Field M.C. (2004). Eukaryotic Cell Evolution from a Comparative Genomic Perspective: The Endomembrane System.
- Dacks J.B. y Field M.C. (2007). Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *J Cell Sci* **120**: 2977-2985.
- Dancourt J. y Barlowe C. (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem* **79**: 777-802.
- de Cubas A.A., Leandro-Garcia L.J., Schiavi F., Mancikova V., Comino-Mendez I., Inglada-Perez L., Perez M., Ibarz N., Ximenez-Embun P., Lopez-Jimenez E., Leton R., Maliszewska A., Gomez Grana A., Bernal C., Alvarez-Escola C., Rodriguez-Antona C., Opocher G., Munoz J., Megias D., Cascon A. y Robledo M. (2013). Integrative analysis of miRNA and mRNA expression profiles in pheochromocytoma and paraganglioma identifies genotype-specific markers and potentially regulated pathways. *Endocr Relat Cancer*.
- de Wit H. (2010). Molecular mechanism of secretory vesicle docking. *Biochem Soc Trans* **38**: 192-198.
- Deacon S.W., Serpinskaya A.S., Vaughan P.S., Lopez Fanarraga M., Vernos I., Vaughan K.T. y Gelfand V.I. (2003). Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol* **160**: 297-301.
- Dejgaard S.Y., Murshid A., Erman A., Kizilay O., Verbich D., Lodge R., Dejgaard K., Ly-Hartig T.B., Pepperkok R., Simpson J.C. y Presley J.F. (2008). Rab18 and Rab43 have key roles in ER-Golgi trafficking. *J Cell Sci* **121**: 2768-2781.
- del Toro D., Alberch J., Lazaro-Dieguez F., Martin-Ibanez R., Xifro X., Egea G. y Canals J.M. (2009). Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* **20**: 1478-1492.
- Delprato A., Merithew E. y Lambright D.G. (2004). Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell* **118**: 607-617.
- Derivery E., Sousa C., Gautier J.J., Lombard B., Loew D. y Gautreau A. (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell* **17**: 712-723.
- Dhanvantari S. y Loh Y.P. (2000). Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J Biol Chem* **275**: 29887-29893.
- Di Pietro S.M., Falcon-Perez J.M., Tenza D., Setty S.R., Marks M.S., Raposo G. y Dell'Angelica E.C. (2006). BLOC-1 interacts with BLOC-2 and the AP-3 complex to facilitate protein trafficking on endosomes. *Mol Biol Cell* **17**: 4027-4038.

- Dikeakos J.D., Di Lello P., Lacombe M.J., Ghirlando R., Legault P., Reudelhuber T.L. y Omichinski J.G. (2009). Functional and structural characterization of a dense core secretory granule sorting domain from the PC1/3 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 7408-7413.
- Dikeakos J.D. y Reudelhuber T.L. (2007). Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out. *J Cell Biol* **177**: 191-196.
- Dittie A.S., Hajibagheri N. y Tooze S.A. (1996). The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor. *J Cell Biol* **132**: 523-536.
- Dittie A.S., Klumperman J. y Tooze S.A. (1999). Differential distribution of mannose-6-phosphate receptors and furin in immature secretory granules. *J Cell Sci* **112** (Pt 22): 3955-3966.
- Dittie A.S., Thomas L., Thomas G. y Tooze S.A. (1997). Interaction of furin in immature secretory granules from neuroendocrine cells with the AP-1 adaptor complex is modulated by casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* **16**: 4859-4870.
- Dumas J.J., Zhu Z., Connolly J.L. y Lambright D.G. (1999). Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure* **7**: 413-423.
- Durbeej M. y Campbell K.P. (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* **12**: 349-361.
- Eathiraj S., Pan X., Ritacco C. y Lambright D.G. (2005). Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* **436**: 415-419.
- Eaton B.A., Haugwitz M., Lau D. y Moore H.P. (2000). Biogenesis of regulated exocytotic carriers in neuroendocrine cells. *J Neurosci* **20**: 7334-7344.
- Echard A., Jollivet F., Martinez O., Lacapere J.J., Rousselet A., Janoueix-Lerosey I. y Goud B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**: 580-585.
- Elias S., Delestre C., Ory S., Marais S., Courel M., Vazquez-Martinez R., Bernard S., Coquet L., Malagon M.M., Driouch A., Chan P., Gasman S., Anouar Y. y Montero-Hadjadje M. (2012). Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* **153**: 4444-4456.
- Falcon-Perez J.M., Starcevic M., Gautam R. y Dell'Angelica E.C. (2002). BLOC-1, a novel complex containing the pallidin and muted proteins involved in the biogenesis of melanosomes and platelet-dense granules. *J Biol Chem* **277**: 28191-28199.
- Fares F. (2006). The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists. *Biochim Biophys Acta* **1760**: 560-567.
- Farnsworth C.C., Seabra M.C., Ericsson L.H., Gelb M.H. y 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**: 11963-11967.
- Faundez V., Horng J.T. y Kelly R.B. (1998). A function for the AP3 coat complex in synaptic vesicle formation from endosomes. *Cell* **93**: 423-432.
- Ferguson S.M. y De Camilli P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 75-88.
- Fernandez C.J., Haugwitz M., Eaton B. y Moore H.P. (1997). Distinct molecular events during secretory granule biogenesis revealed by sensitivities to brefeldin A. *Mol Biol Cell* **8**: 2171-2185.
- Fischer von Mollard G., Sudhof T.C. y Jahn R. (1991). A small GTP-binding protein dissociates from synaptic vesicles during exocytosis. *Nature* **349**: 79-81.
- Fukuda M., Kanno E., Ogata Y., Saegusa C., Kim T., Loh Y.P. y Yamamoto A. (2003). Nerve growth factor-dependent sorting of synaptotagmin IV protein to mature dense-core vesicles that undergo calcium-dependent exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **278**: 3220-3226.
- Fukuda M., Kanno E., Saegusa C., Ogata Y. y Kuroda T.S. (2002). Slp4-a/granophilin-a regulates dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **277**: 39673-39678.

- Fukuda M., Kuroda T.S. y Mikoshiba K. (2002). Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem* **277**: 12432-12436.
- Fung M.M., Viveros O.H. y O'Connor D.T. (2008). Diseases of the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)* **192**: 325-335.
- Gerdes H.H. (2008). Membrane traffic in the secretory pathway. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2779-2780.
- Ghiani C.A., Starcevic M., Rodriguez-Fernandez I.A., Nazarian R., Cheli V.T., Chan L.N., Malvar J.S., de Vellis J., Sabatti C. y Dell'Angelica E.C. (2010). The dysbindin-containing complex (BLOC-1) in brain: developmental regulation, interaction with SNARE proteins and role in neurite outgrowth. *Mol Psychiatry* **15**: 115, 204-115.
- Gimenez-Roqueplo A.P., Dahia P.L. y Robledo M. (2012). An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm Metab Res* **44**: 328-333.
- Glick B.S. y Nakano A. (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 113-132.
- Glombik M.M. y Gerdes H.H. (2000). Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones: secretory granule biogenesis revisited. *Biochimie* **82**: 315-326.
- Glombik M.M., Kromer A., Salm T., Huttner W.B. y Gerdes H.H. (1999). The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules. *EMBO J* **18**: 1059-1070.
- Goldstein L.S. y Yang Z. (2000). Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci* **23**: 39-71.
- Goody R.S., Rak A. y Alexandrov K. (2005). The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments. *Cell Mol Life Sci* **62**: 1657-1670.
- Greve P., Braquart-Varnier C., Strub J.M., Felix C., Van Dorsselaer A. y Martin G. (2004). The glycosylated androgenic hormone of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea). *Gen Comp Endocrinol* **136**: 389-397.
- Guillemot J., Anouar Y., Montero-Hadjadje M., Grouzmann E., Grumolato L., Roshmaninho-Salgado J., Turquier V., Duparc C., Lefebvre H., Plouin P.F., Klein M., Muresan M., Chow B.K., Vaudry H. y Yon L. (2006). Circulating EM66 is a highly sensitive marker for the diagnosis and follow-up of pheochromocytoma. *Int J Cancer* **118**: 2003-2012.
- Gumbiner B. y Kelly R.B. (1982). Two distinct intracellular pathways transport secretory and membrane glycoproteins to the surface of pituitary tumor cells. *Cell* **28**: 51-59.
- Guo W., Grant A. y Novick P. (1999). Exo84p is an exocyst protein essential for secretion. *J Biol Chem* **274**: 23558-23564.
- Guo W., Roth D., Walch-Solimena C. y Novick P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J* **18**: 1071-1080.
- Guo W., Tamanoi F. y Novick P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol* **3**: 353-360.
- Haas A.K., Yoshimura S., Stephens D.J., Preisinger C., Fuchs E. y Barr F.A. (2007). Analysis of GTPase-activating proteins: Rab1 and Rab43 are key Rabs required to maintain a functional Golgi complex in human cells. *J Cell Sci* **120**: 2997-3010.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* **41**: 95-98.
- Hammer J.A., 3rd y Wu X.S. (2002). Rabs grab motors: defining the connections between Rab GTPases and motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* **14**: 69-75.
- Hashim S., Mukherjee K., Raje M., Basu S.K. y Mukhopadhyay A. (2000). Live *Salmonella* modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem* **275**: 16281-16288.
- Heider M.R. y Munson M. (2012). Exorcising the exocyst complex. *Traffic* **13**: 898-907.

- Hermann G.J., Scavarda E., Weis A.M., Saxton D.S., Thomas L.L., Salesky R., Somhegyi H., Curtin T.P., Barrett A., Foster O.K., Vine A., Erlich K., Kwan E., Rabbitts B.M. y Warren K. (2012). C. elegans BLOC-1 functions in trafficking to lysosome-related gut granules. *PLoS One* **7**: e43043.
- Heyduk T. (2002). Measuring protein conformational changes by FRET/LRET. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 292-296.
- Hikita T., Taya S., Fujino Y., Taneichi-Kuroda S., Ohta K., Tsuboi D., Shinoda T., Kuroda K., Funahashi Y., Uruguchi-Asaki J., Hashimoto R. y Kaibuchi K. (2009). Proteomic analysis reveals novel binding partners of dysbindin, a schizophrenia-related protein. *J Neurochem* **110**: 1567-1574.
- Hinners I., Wendler F., Fei H., Thomas L., Thomas G. y Tooze S.A. (2003). AP-1 recruitment to VAMP4 is modulated by phosphorylation-dependent binding of PACS-1. *EMBO Rep* **4**: 1182-1189.
- Hirokawa N., Niwa S. y Tanaka Y. (2010). Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* **68**: 610-638.
- Hofsli E., Thommesen L., Yadetie F., Langaas M., Kusnierczyk W., Falkmer U., Sandvik A.K. y Laegreid A. (2005). Identification of novel growth factor-responsive genes in neuroendocrine gastrointestinal tumour cells. *Br J Cancer* **92**: 1506-1516.
- Holz R.W., Brondyk W.H., Senter R.A., Kuizon L. y Macara I.G. (1994). Evidence for the involvement of Rab3A in Ca(2+)-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* **269**: 10229-10234.
- Hook V., Funkelstein L., Lu D., Bark S., Wegrzyn J. y Hwang S.R. (2008). Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**: 393-423.
- Hosaka M. y Watanabe T. (2010). Secretogranin III: a bridge between core hormone aggregates and the secretory granule membrane. *Endocr J* **57**: 275-286.
- Hsu S.C., TerBush D., Abraham M. y Guo W. (2004). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol* **233**: 243-265.
- Hsu S.C., Ting A.E., Hazuka C.D., Davanger S., Kenny J.W., Kee Y. y Scheller R.H. (1996). The mammalian brain rsec6/8 complex. *Neuron* **17**: 1209-1219.
- Huang L., Kuo Y.M. y Gitschier J. (1999). The pallid gene encodes a novel, syntaxin 13-interacting protein involved in platelet storage pool deficiency. *Nat Genet* **23**: 329-332.
- Huh Y.H., Jeon S.H. y Yoo S.H. (2003). Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J Biol Chem* **278**: 40581-40589.
- Huizing M., Anikster Y. y Gahl W.A. (2000). Hermansky-Pudlak syndrome and related disorders of organelle formation. *Traffic* **1**: 823-835.
- Huttner W.B. (1988). Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu Rev Physiol* **50**: 363-376.
- Irminger J.C., Verchere C.B., Meyer K. y Halban P.A. (1997). Proinsulin targeting to the regulated pathway is not impaired in carboxypeptidase E-deficient Cpefat/Cpefat mice. *J Biol Chem* **272**: 27532-27534.
- Ito Y., Hirochika H. y Kurata N. (2002). Organ-specific alternative transcripts of KNOX family class 2 homeobox genes of rice. *Gene* **288**: 41-47.
- Jackson C.L. (2009). Mechanisms of transport through the Golgi complex. *J Cell Sci* **122**: 443-452.
- Jahn R. y Scheller R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 631-643.
- Jimenez C., Cote G., Arnold A. y Gagel R.F. (2006). Review: Should patients with apparently sporadic pheochromocytomas or paragangliomas be screened for hereditary syndromes? *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 2851-2858.
- Johannes L., Lledo P.M., Chameau P., Vincent J.D., Henry J.P. y Darchen F. (1998). Regulation of the Ca²⁺ sensitivity of exocytosis by Rab3a. *J Neurochem* **71**: 1127-1133.
- Johannes L., Lledo P.M., Roa M., Vincent J.D., Henry J.P. y Darchen F. (1994). The GTPase Rab3a negatively controls calcium-dependent exocytosis in neuroendocrine cells. *EMBO J* **13**: 2029-2037.

- Jones S.M., Howell K.E., Henley J.R., Cao H. y McNiven M.A. (1998). Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science* **279**: 573-577.
- Jordens I., Fernandez-Borja M., Marsman M., Dusseljee S., Janssen L., Calafat J., Janssen H., Wubbolts R. y Neefjes J. (2001). The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* **11**: 1680-1685.
- Jordens I., Marsman M., Kuijl C. y Neefjes J. (2005). Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. *Traffic* **6**: 1070-1077.
- Jutras I., Seidah N.G. y Reudelhuber T.L. (2000). A predicted alpha -helix mediates targeting of the proprotein convertase PC1 to the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* **275**: 40337-40343.
- Kaiya H., Kodama S., Ishiguro K., Matsuda K., Uchiyama M., Miyazato M. y Kangawa K. (2009). Ghrelin-like peptide with fatty acid modification and O-glycosylation in the red stingray, *Dasyatis akajei*. *BMC Biochem* **10**: 30.
- Kakhlon O., Sakya P., Larijani B., Watson R. y Tooze S.A. (2006). GGA function is required for maturation of neuroendocrine secretory granules. *EMBO J* **25**: 1590-1602.
- Kalinina T., Gungor C., Thieltges S., Moller-Krull M., Penas E.M., Wicklein D., Streichert T., Schumacher U., Kalinin V., Simon R., Otto B., Dierlamm J., Schwarzenbach H., Effenberger K.E., Bockhorn M., Izbicki J.R. y Yekebas E.F. (2010). Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer* **10**: 295.
- Karcher R.L., Deacon S.W. y Gelfand V.I. (2002). Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol* **12**: 21-27.
- Kelly R.B. (1985). Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* **230**: 25-32.
- Khvotchev M.V., Ren M., Takamori S., Jahn R. y Sudhof T.C. (2003). Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca²⁺-regulated versus constitutive exocytosis. *J Neurosci* **23**: 10531-10539.
- Kim T., Gondre-Lewis M.C., Arnaoutova I. y Loh Y.P. (2006). Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)* **21**: 124-133.
- Kim T., Tao-Cheng J.H., Eiden L.E. y Loh Y.P. (2001). Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* **106**: 499-509.
- Kleizen B. y Braakman I. (2004). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 343-349.
- Klumperman J., Kuliawat R., Griffith J.M., Geuze H.J. y Arvan P. (1998). Mannose 6-phosphate receptors are sorted from immature secretory granules via adaptor protein AP-1, clathrin, and syntaxin 6-positive vesicles. *J Cell Biol* **141**: 359-371.
- Kreitzer G., Marmorstein A., Okamoto P., Vallee R. y Rodriguez-Boulan E. (2000). Kinesin and dynamin are required for post-Golgi transport of a plasma-membrane protein. *Nat Cell Biol* **2**: 125-127.
- Kromer A., Glombik M.M., Huttner W.B. y Gerdes H.H. (1998). Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *J Cell Biol* **140**: 1331-1346.
- Kuliawat R. y Arvan P. (1994). Distinct molecular mechanisms for protein sorting within immature secretory granules of pancreatic beta-cells. *J Cell Biol* **126**: 77-86.
- Kuliawat R., Klumperman J., Ludwig T. y Arvan P. (1997). Differential sorting of lysosomal enzymes out of the regulated secretory pathway in pancreatic beta-cells. *J Cell Biol* **137**: 595-608.
- Kuroda T.S. y Fukuda M. (2005). Functional analysis of Slac2-c/MyRIP as a linker protein between melanosomes and myosin VIIa. *J Biol Chem* **280**: 28015-28022.
- Kuroda T.S., Itoh T. y Fukuda M. (2005). Functional analysis of slac2-a/melanophilin as a linker protein between Rab27A and myosin Va in melanosome transport. *Methods Enzymol* **403**: 419-431.
- Lafer E.M. (2002). Clathrin-protein interactions. *Traffic* **3**: 513-520.
- Lamacz M., Tonon M.C., Louiset E., Cazin L. y Vaudry H. (1991). [The intermediate lobe of the pituitary, model of neuroendocrine communication]. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* **99**: 205-219.

- Lane K.T. y Beese L.S. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J Lipid Res* **47**: 681-699.
- Lankat-Buttgereit B., Fehmann H.C., Hering B.J., Bretzel R.G. y Goke B. (1994). Expression of the ras-related rab3a gene in human insulinomas and normal human pancreatic islets. *Pancreas* **9**: 434-438.
- Larimore J., Tornieri K., Ryder P.V., Gokhale A., Zlatic S.A., Craige B., Lee J.D., Talbot K., Pare J.F., Smith Y. y Faundez V. (2011). The schizophrenia susceptibility factor dysbindin and its associated complex sort cargoes from cell bodies to the synapse. *Mol Biol Cell* **22**: 4854-4867.
- Lee M.T., Mishra A. y Lambright D.G. (2009). Structural mechanisms for regulation of membrane traffic by rab GTPases. *Traffic* **10**: 1377-1389.
- Leung K.F., Baron R., Ali B.R., Magee A.I. y Seabra M.C. (2007). Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation. *J Biol Chem* **282**: 1487-1497.
- Leung K.F., Baron R. y Seabra M.C. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases. *J Lipid Res* **47**: 467-475.
- Li X., Sapp E., Chase K., Comer-Tierney L.A., Masso N., Alexander J., Reeves P., Kegel K.B., Valencia A., Esteves M., Aronin N. y Difiglia M. (2009). Disruption of Rab11 activity in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* **36**: 374-383.
- Li X., Sapp E., Valencia A., Kegel K.B., Qin Z.H., Alexander J., Masso N., Reeves P., Ritch J.J., Zeitlin S., Aronin N. y Difiglia M. (2008). A function of huntingtin in guanine nucleotide exchange on Rab11. *Neuroreport* **19**: 1643-1647.
- Li X., Standley C., Sapp E., Valencia A., Qin Z.H., Kegel K.B., Yoder J., Comer-Tierney L.A., Esteves M., Chase K., Alexander J., Masso N., Sobin L., Bellve K., Tuft R., Lifshitz L., Fogarty K., Aronin N. y DiFiglia M. (2009). Mutant huntingtin impairs vesicle formation from recycling endosomes by interfering with Rab11 activity. *Mol Cell Biol* **29**: 6106-6116.
- Li X., Valencia A., McClory H., Sapp E., Kegel K.B. y Difiglia M. (2012). Deficient Rab11 activity underlies glucose hypometabolism in primary neurons of Huntington's disease mice. *Biochem Biophys Res Commun* **421**: 727-730.
- Li X., Valencia A., Sapp E., Masso N., Alexander J., Reeves P., Kegel K.B., Aronin N. y Difiglia M. (2010). Aberrant Rab11-dependent trafficking of the neuronal glutamate transporter EAAC1 causes oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *J Neurosci* **30**: 4552-4561.
- Li Y., Meng X., Feng H., Zhang G., Liu C. y Li P. (1999). Over-expression of the RAB5 gene in human lung adenocarcinoma cells with high metastatic potential. *Chin Med Sci J* **14**: 96-101.
- Lippincott-Schwartz J., Roberts T.H. y Hirschberg K. (2000). Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 557-589.
- Lou H., Smith A.M., Coates L.C., Cawley N.X., Loh Y.P. y Birch N.P. (2007). The transmembrane domain of the prohormone convertase PC3: a key motif for targeting to the regulated secretory pathway. *Mol Cell Endocrinol* **267**: 17-25.
- Lowe M. (2011). Structural organization of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **23**: 85-93.
- Lu L., Cai Q., Tian J.H. y Sheng Z.H. (2009). Snapin associates with late endocytic compartments and interacts with late endosomal SNAREs. *Biosci Rep* **29**: 261-269.
- Lutcke A., Parton R.G., Murphy C., Olkkonen V.M., Dupree P., Valencia A., Simons K. y Zerial M. (1994). Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression. *J Cell Sci* **107** (Pt 12): 3437-3448.
- Malagon M.M., Cruz D., Vazquez-Martinez R., Peinado J.R., Anouar Y., Tonon M.C., Vaudry H., Gracia-Navarro F. y Castano J.P. (2005). Analysis of Rab18 and a new golgin in the secretory pathway. *Ann N Y Acad Sci* **1040**: 137-139.
- Marsh B.J., Volkman N., McIntosh J.R. y Howell K.E. (2004). Direct continuities between cisternae at different levels of the Golgi complex in glucose-stimulated mouse islet beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5565-5570.

- Martelli A.M., Baldini G., Tabellini G., Koticha D. y Bareggi R. (2000). Rab3A and Rab3D control the total granule number and the fraction of granules docked at the plasma membrane in PC12 cells. *Traffic* **1**: 976-986.
- Martin S., Driessen K., Nixon S.J., Zerial M. y Parton R.G. (2005). Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism. *J Biol Chem* **280**: 42325-42335.
- Matsuzaki F., Shirane M., Matsumoto M. y Nakayama K.I. (2011). Protrudin serves as an adaptor molecule that connects KIF5 and its cargoes in vesicular transport during process formation. *Mol Biol Cell* **22**: 4602-4620.
- Mead C.L., Kuzyk M.A., Moradian A., Wilson G.M., Holt R.A. y Morin G.B. (2010). Cytosolic protein interactions of the schizophrenia susceptibility gene dysbindin. *J Neurochem* **113**: 1491-1503.
- Melmed S. (2002). The Pituitary.
- Melmed S., Casanueva F.F., Cavagnini F., Chanson P., Frohman L., Grossman A., Ho K., Kleinberg D., Lamberts S., Laws E., Lombardi G., Vance M.L., Werder K.V., Wass J. y Giustina A. (2002). Guidelines for acromegaly management. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 4054-4058.
- Menasche G., Pastural E., Feldmann J., Certain S., Ersoy F., Dupuis S., Wulffraat N., Bianchi D., Fischer A., Le Deist F. y de Saint Basile G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* **25**: 173-176.
- Mesaki K., Tanabe K., Obayashi M., Oe N. y Takei K. (2011). Fission of tubular endosomes triggers endosomal acidification and movement. *PLoS One* **6**: e19764.
- Miaczynska M., Pelkmans L. y Zerial M. (2004). Not just a sink: endosomes in control of signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 400-406.
- Mizuno-Yamasaki E., Medkova M., Coleman J. y Novick P. (2010). Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev Cell* **18**: 828-840.
- Montero-Hadjadje M., Elias S., Chevalier L., Benard M., Tanguy Y., Turquier V., Galas L., Yon L., Malagon M.M., Driouch A., Gasman S. y Anouar Y. (2009). Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem* **284**: 12420-12431.
- Morvan J. y Tooze S.A. (2008). Discovery and progress in our understanding of the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells. *Histochem Cell Biol* **129**: 243-252.
- Mukherjee S., Liu X., Arasaki K., McDonough J., Galan J.E. y Roy C.R. (2011). Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature* **477**: 103-106.
- Muller L. y Lindberg I. (1999). The cell biology of the prohormone convertases PC1 and PC2. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **63**: 69-108.
- Munro S. (1998). Localization of proteins to the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* **8**: 11-15.
- Nakano A. y Luini A. (2010). Passage through the Golgi. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 471-478.
- Nazarian R., Starcevic M., Spencer M.J. y Dell'Angelica E.C. (2006). Reinvestigation of the dysbindin subunit of BLOC-1 (biogenesis of lysosome-related organelles complex-1) as a dystrobrevin-binding protein. *Biochem J* **395**: 587-598.
- Newell-Litwa K., Salazar G., Smith Y. y Faundez V. (2009). Roles of BLOC-1 and adaptor protein-3 complexes in cargo sorting to synaptic vesicles. *Mol Biol Cell* **20**: 1441-1453.
- Nishimura N., Goji J., Nakamura H., Orita S., Takai Y. y Sano K. (1995). Cloning of a brain-type isoform of human Rab GDI and its expression in human neuroblastoma cell lines and tumor specimens. *Cancer Res* **55**: 5445-5450.
- Nishimura N., Nakamura H., Takai Y. y Sano K. (1994). Molecular cloning and characterization of two rab GDI species from rat brain: brain-specific and ubiquitous types. *J Biol Chem* **269**: 14191-14198.
- Niwa S., Tanaka Y. y Hirokawa N. (2008). KIF1Bbeta- and KIF1A-mediated axonal transport of presynaptic regulator Rab3 occurs in a GTP-dependent manner through DENN/MADD. *Nat Cell Biol* **10**: 1269-1279.

- Nordmann M., Cabrera M., Perz A., Brocker C., Ostrowicz C., Engelbrecht-Vandre S. y Ungermann C. (2010). The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Curr Biol* **20**: 1654-1659.
- Nottingham R.M., Ganley I.G., Barr F.A., Lambright D.G. y Pfeffer S.R. (2011). RUTBC1 protein, a Rab9A effector that activates GTP hydrolysis by Rab32 and Rab33B proteins. *J Biol Chem* **286**: 33213-33222.
- Nottingham R.M. y Pfeffer S.R. (2009). Defining the boundaries: Rab GEFs and GAPs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14185-14186.
- Nottingham R.M., Pusapati G.V., Ganley I.G., Barr F.A., Lambright D.G. y Pfeffer S.R. (2012). RUTBC2 protein, a Rab9A effector and GTPase-activating protein for Rab36. *J Biol Chem* **287**: 22740-22748.
- Oesterlin L.K., Goody R.S. y Itzen A. (2012). Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 5621-5626.
- Ooi C.E., Dell'Angelica E.C. y Bonifacino J.S. (1998). ADP-Ribosylation factor 1 (ARF1) regulates recruitment of the AP-3 adaptor complex to membranes. *J Cell Biol* **142**: 391-402.
- Orci L., Ravazzola M., Amherdt M., Madsen O., Perrelet A., Vassalli J.D. y Anderson R.G. (1986). Conversion of proinsulin to insulin occurs coordinately with acidification of maturing secretory vesicles. *J Cell Biol* **103**: 2273-2281.
- Ortiz D., Medkova M., Walch-Solimena C. y Novick P. (2002). Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J Cell Biol* **157**: 1005-1015.
- Ostermeier C. y Brunger A.T. (1999). Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* **96**: 363-374.
- Ozeki S., Cheng J., Tauchi-Sato K., Hatano N., Taniguchi H. y Fujimoto T. (2005). Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci* **118**: 2601-2611.
- Pance A., Livesey F.J. y Jackson A.P. (2006). A role for the transcriptional repressor REST in maintaining the phenotype of neurosecretory-deficient PC12 cells. *J Neurochem* **99**: 1435-1444.
- Park J.J. y Loh Y.P. (2008). How peptide hormone vesicles are transported to the secretion site for exocytosis. *Mol Endocrinol* **22**: 2583-2595.
- Peinado J.R., Vazquez-Martinez R., Cruz-Garcia D., Ruiz-Navarro A., Anouar Y., Tonon M.C., Vaudry H., Gracia-Navarro F., Castano J.P. y Malagon M.M. (2006). Differential expression and processing of chromogranin A and secretogranin II in relation to the secretory status of endocrine cells. *Endocrinology* **147**: 1408-1418.
- Pereira-Leal J.B. y Seabra M.C. (2001). Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* **313**: 889-901.
- Pfeffer S. (2005). A model for Rab GTPase localization. *Biochem Soc Trans* **33**: 627-630.
- Pfeffer S. y Aivazian D. (2004). Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 886-896.
- Pfister K.K., Fisher E.M., Gibbons I.R., Hays T.S., Holzbaur E.L., McIntosh J.R., Porter M.E., Schroer T.A., Vaughan K.T., Witman G.B., King S.M. y Vallee R.B. (2005). Cytoplasmic dynein nomenclature. *J Cell Biol* **171**: 411-413.
- Pritchard L.E. y White A. (2007). Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways. *Endocrinology* **148**: 4201-4207.
- Pulido M.R., Diaz-Ruiz A., Jimenez-Gomez Y., Garcia-Navarro S., Gracia-Navarro F., Tinahones F., Lopez-Miranda J., Fruhbeck G., Vazquez-Martinez R. y Malagon M.M. (2011). Rab18 dynamics in adipocytes in relation to lipogenesis, lipolysis and obesity. *PLoS One* **6**: e22931.
- Rak A., Pylypenko O., Durek T., Watzke A., Kushnir S., Brunsveld L., Waldmann H., Goody R.S. y Alexandrov K. (2003). Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science* **302**: 646-650.

- Rambourg A., Clermont Y., Chretien M. y Olivier L. (1992). Formation of secretory granules in the Golgi apparatus of prolactin cells in the rat pituitary gland: a stereoscopic study. *Anat Rec* **232**: 169-179.
- Regazzi R., Ravazzola M., Iezzi M., Lang J., Zahraoui A., Anderegg E., Morel P., Takai Y. y Wollheim C.B. (1996). Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells. *J Cell Sci* **109** (Pt 9): 2265-2273.
- Richards P., Didszun C., Campesan S., Simpson A., Horley B., Young K.W., Glynn P., Cain K., Kyriacou C.P., Giorgini F. y Nicotera P. (2011). Dendritic spine loss and neurodegeneration is rescued by Rab11 in models of Huntington's disease. *Cell Death Differ* **18**: 191-200.
- Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y. y Zerial M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**: 735-749.
- Rivera-Molina F.E. y Novick P.J. (2009). A Rab GAP cascade defines the boundary between two Rab GTPases on the secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 14408-14413.
- Robinson L.J. y Martin T.F. (1998). Docking and fusion in neurosecretion. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 483-492.
- Rodriguez-Fernandez I.A. y Dell'Angelica E.C. (2009). A data-mining approach to rank candidate protein-binding partners-The case of biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 (BLOC-1). *J Inherit Metab Dis* **32**: 190-203.
- Rosa P., Mantovani S., Rosboch R. y Huttner W.B. (1992). Monensin and brefeldin A differentially affect the phosphorylation and sulfation of secretory proteins. *J Biol Chem* **267**: 12227-12232.
- Rothman J.E. (1994). Intracellular membrane fusion. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* **29**: 81-96.
- Roy C.R. y Mukherjee S. (2009). Bacterial FIC Proteins AMP Up Infection. *Sci Signal* **2**: pe14.
- Rozell T.G. y Okrainetz R.J. (2009). FSH: One Hormone with Multiple Forms, or a Family of Multiple Hormones. *Reproductive Endocrinol (eds. Chedrese, P.J.)*: 145-160.
- Rudolf R., Salm T., Rustom A. y Gerdes H.H. (2001). Dynamics of immature secretory granules: role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering. *Mol Biol Cell* **12**: 1353-1365.
- Rupnik M., Kreft M., Nothias F., Grilc S., Bobanovic L.K., Johannes L., Kiauta T., Vernier P., Darchen F. y Zorec R. (2007). Distinct role of Rab3A and Rab3B in secretory activity of rat melanotrophs. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**: C98-105.
- Russell R.G. (2011). Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* **49**: 2-19.
- Sacher M., Kim Y.G., Lavie A., Oh B.H. y Segev N. (2008). The TRAPP complex: insights into its architecture and function. *Traffic* **9**: 2032-2042.
- Schekman R. y Orci L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**: 1526-1533.
- Scheuner D. y Kaufman R.J. (2008). The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev* **29**: 317-333.
- Schluter O.M., Khvotchev M., Jahn R. y Sudhof T.C. (2002). Localization versus function of Rab3 proteins. Evidence for a common regulatory role in controlling fusion. *J Biol Chem* **277**: 40919-40929.
- Schluter O.M., Schmitz F., Jahn R., Rosenmund C. y Sudhof T.C. (2004). A complete genetic analysis of neuronal Rab3 function. *J Neurosci* **24**: 6629-6637.
- Schoebel S., Oesterlin L.K., Blankenfeldt W., Goody R.S. y Itzen A. (2009). RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity. *Mol Cell* **36**: 1060-1072.
- Schroer T.A. (2004). Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 759-779.
- Schwartz S.L., Cao C., Pylypenko O., Rak A. y Wandinger-Ness A. (2007). Rab GTPases at a glance. *J Cell Sci* **120**: 3905-3910.
- Seabra M.C. (1996). New insights into the pathogenesis of choroideremia: a tale of two REPs. *Ophthalmic Genet* **17**: 43-46.

- Seabra M.C. y Wasmeier C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 451-457.
- Seaman M.N. (2008). Endosome protein sorting: motifs and machinery. *Cell Mol Life Sci* **65**: 2842-2858.
- Seidah N.G. (2011). What lies ahead for the proprotein convertases? *Ann N Y Acad Sci* **1220**: 149-161.
- Seidah N.G. y Prat A. (2002). Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem* **38**: 79-94.
- Setty S.R., Tenza D., Truschel S.T., Chou E., Sviderskaya E.V., Theos A.C., Lamoreux M.L., Di Pietro S.M., Starcevic M., Bennett D.C., Dell'Angelica E.C., Raposo G. y Marks M.S. (2007). BLOC-1 is required for cargo-specific sorting from vacuolar early endosomes toward lysosome-related organelles. *Mol Biol Cell* **18**: 768-780.
- Sheetz M.P. (1999). Motor and cargo interactions. *Eur J Biochem* **262**: 19-25.
- Sivars U., Aivazian D. y Pfeffer S.R. (2003). Yip3 catalyses the dissociation of endosomal Rab-GDI complexes. *Nature* **425**: 856-859.
- Sollner T., Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P. y Rothman J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**: 318-324.
- Sonnichsen B., De Renzis S., Nielsen E., Rietdorf J. y Zerial M. (2000). Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol* **149**: 901-914.
- Spang A. (2009). On vesicle formation and tethering in the ER-Golgi shuttle. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 531-536.
- Spangler S.A. y Hoogenraad C.C. (2007). Liprin-alpha proteins: scaffold molecules for synapse maturation. *Biochem Soc Trans* **35**: 1278-1282.
- Steinert J.R., Campesan S., Richards P., Kyriacou C.P., Forsythe I.D. y Giorgini F. (2012). Rab11 rescues synaptic dysfunction and behavioural deficits in a Drosophila model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **21**: 2912-2922.
- Stenmark H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 513-525.
- Stenmark H., Valencia A., Martinez O., Ullrich O., Goud B. y Zerial M. (1994). Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *EMBO J* **13**: 575-583.
- Stettler H., Beuret N., Prescianotto-Baschong C., Fayard B., Taupenot L. y Spiess M. (2009). Determinants for chromogranin A sorting into the regulated secretory pathway are also sufficient to generate granule-like structures in non-endocrine cells. *Biochem J* **418**: 81-91.
- Strating J.R., Hafmans T.G. y Martens G.J. (2009). Functional diversity among p24 subfamily members. *Biol Cell* **101**: 207-219.
- Stroupe C. y Brunger A.T. (2000). Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J Mol Biol* **304**: 585-598.
- Subramani D. y Alahari S.K. (2010). Integrin-mediated function of Rab GTPases in cancer progression. *Mol Cancer* **9**: 312.
- Takamori S., Holt M., Stenius K., Lemke E.A., Grønborg M., Riedel D., Urlaub H., Schenck S., Brügger B., Ringler P., Müller S.A., Rammner B., Gräter F., Hub J.S., De Groot B.L., Mieskes G., Moriyama Y., Klingauf J., Grubmüller H., Heuser J., Wieland F. y Jahn R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**: 831-846.
- Taupenot L., Harper K.L., Mahapatra N.R., Parmer R.J., Mahata S.K. y O'Connor D.T. (2002). Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A. *J Cell Sci* **115**: 4827-4841.
- TerBush D.R., Maurice T., Roth D. y Novick P. (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**: 6483-6494.

- Thoma N.H., Iakovenko A., Kalinin A., Waldmann H., Goody R.S. y Alexandrov K. (2001). Allosteric regulation of substrate binding and product release in geranylgeranyltransferase type II. *Biochemistry* **40**: 268-274.
- Thoma N.H., Niculae A., Goody R.S. y Alexandrov K. (2001). Double prenylation by RabGGTase can proceed without dissociation of the mono-prenylated intermediate. *J Biol Chem* **276**: 48631-48636.
- Timmers H.J., Gimenez-Roqueplo A.P., Mannelli M. y Pacak K. (2009). Clinical aspects of SDHx-related pheochromocytoma and paraganglioma. *Endocr Relat Cancer* **16**: 391-400.
- Tooze S.A. (1998). Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim Biophys Acta* **1404**: 231-244.
- Tooze S.A., Flatmark T., Tooze J. y Huttner W.B. (1991). Characterization of the immature secretory granule, an intermediate in granule biogenesis. *J Cell Biol* **115**: 1491-1503.
- Tooze S.A., Martens G.J. y Huttner W.B. (2001). Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol* **11**: 116-122.
- Travers K.J., Patil C.K., Wodicka L., Lockhart D.J., Weissman J.S. y Walter P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**: 249-258.
- True L., Coleman I., Hawley S., Huang C.Y., Gifford D., Coleman R., Beer T.M., Gelmann E., Datta M., Mostaghel E., Knudsen B., Lange P., Vessella R., Lin D., Hood L. y Nelson P.S. (2006). A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10991-10996.
- Tsuboi T. y Fukuda M. (2005). The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* **280**: 39253-39259.
- Tsuboi T. y Fukuda M. (2006). The Slp4-a linker domain controls exocytosis through interaction with Munc18-1/syntaxin-1a complex. *Mol Biol Cell* **17**: 2101-2112.
- Tsuboi T., Ravier M.A., Xie H., Ewart M.A., Gould G.W., Baldwin S.A. y Rutter G.A. (2005). Mammalian exocyst complex is required for the docking step of insulin vesicle exocytosis. *J Biol Chem* **280**: 25565-25570.
- Urbe S., Page L.J. y Tooze S.A. (1998). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation in a cell-free assay. *J Cell Biol* **143**: 1831-1844.
- van der Sluijs P., Hull M., Huber L.A., Male P., Goud B. y Mellman I. (1992). Reversible phosphorylation--dephosphorylation determines the localization of rab4 during the cell cycle. *EMBO J* **11**: 4379-4389.
- van Kuppeveld F.J., van Horssen A.M. y Martens G.J. (1997). Intracellular transport, sorting, and proteolytic processing of regulated secretory proteins does not require protein sulfation. *Mol Cell Endocrinol* **136**: 29-35.
- van Rijssel J. y van Buul J.D. (2012). The many faces of the guanine-nucleotide exchange factor trio. *Cell Adh Migr* **6**: 482-487.
- Varlamov O., Wu F., Shields D. y Fricker L.D. (1999). Biosynthesis and packaging of carboxypeptidase D into nascent secretory vesicles in pituitary cell lines. *J Biol Chem* **274**: 14040-14045.
- Varro A., Desmond H., Pauwels S., Gregory H., Young J. y Dockray G.J. (1988). The human gastrin precursor. Characterization of phosphorylated forms and fragments. *Biochem J* **256**: 951-957.
- Vaughan E.E. y Dean D.A. (2006). Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol Ther* **13**: 422-428.
- Vazquez-Martinez R., Cruz-Garcia D., Duran-Prado M., Peinado J.R., Castano J.P. y Malagon M.M. (2007). Rab18 inhibits secretory activity in neuroendocrine cells by interacting with secretory granules. *Traffic* **8**: 867-882.
- Vazquez-Martinez R., Martinez-Fuentes A.J., Pulido M.R., Jimenez-Reina L., Quintero A., Leal-Cerro A., Soto A., Webb S.M., Sucunza N., Bartumeus F., Benito-Lopez P., Galvez-Moreno M.A., Castano

- J.P. y Malagon M.M. (2008). Rab18 is reduced in pituitary tumors causing acromegaly and its overexpression reverts growth hormone hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 2269-2276.
- Vembar S.S. y Brodsky J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 944-957.
- Verhage M. y Sorensen J.B. (2008). Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic* **9**: 1414-1424.
- Verhey K.J., Meyer D., Deehan R., Blenis J., Schnapp B.J., Rapoport T.A. y Margolis B. (2001). Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J Cell Biol* **152**: 959-970.
- Vetter I.R. y Wittinghofer A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304.
- Wang O. y Majzoub J.A. (2010). Adrenocorticotropin. *The Pituitary. Academic Press (ed. S. Melmed)*: 47-81.
- Wang Y., Thiele C. y Huttner W.B. (2000). Cholesterol is required for the formation of regulated and constitutive secretory vesicles from the trans-Golgi network. *Traffic* **1**: 952-962.
- Wang Z. y Thurmond D.C. (2009). Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci* **122**: 893-903.
- Watanabe R. y Riezman H. (2004). Differential ER exit in yeast and mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 350-355.
- Watkinson A., Young J., Varro A. y Dockray G.J. (1989). The isolation and chemical characterization of phosphorylated enkephalin-containing peptides from bovine adrenal medulla. *J Biol Chem* **264**: 3061-3065.
- Wendler F., Page L., Urbe S. y Tooze S.A. (2001). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation requires syntaxin 6. *Mol Biol Cell* **12**: 1699-1709.
- Wickner W. y Schekman R. (2008). Membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 658-664.
- Worby C.A., Mattoo S., Kruger R.P., Corbeil L.B., Koller A., Mendez J.C., Zekarias B., Lazar C. y Dixon J.E. (2009). The fic domain: regulation of cell signaling by adenylation. *Mol Cell* **34**: 93-103.
- Worby P. y McGouran V. (1999). Nurse recruitment. Something to write home about. *Health Serv J* **109**: 29.
- Xu H. y Shields D. (1993). Prohormone processing in the trans-Golgi network: endoproteolytic cleavage of prosomatostatin and formation of nascent secretory vesicles in permeabilized cells. *J Cell Biol* **122**: 1169-1184.
- Yaekura K., Julyan R., Wicksteed B.L., Hays L.B., Alarcon C., Sommers S., Poitout V., Baskin D.G., Wang Y., Philipson L.H. y Rhodes C.J. (2003). Insulin secretory deficiency and glucose intolerance in Rab3A null mice. *J Biol Chem* **278**: 9715-9721.
- Yaman E., Gasper R., Koerner C., Wittinghofer A. y Tazebay U.H. (2009). RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide exchange. *FEBS J* **276**: 4607-4616.
- Yan L.X., Huang X.F., Shao Q., Huang M.Y., Deng L., Wu Q.L., Zeng Y.X. y Shao J.Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* **14**: 2348-2360.
- Yang X., Matern H.T. y Gallwitz D. (1998). Specific binding to a novel and essential Golgi membrane protein (Yip1p) functionally links the transport GTPases Ypt1p and Ypt31p. *EMBO J* **17**: 4954-4963.
- Yang Z., Li H., Chai Z., Fullerton M.J., Cao Y., Toh B.H., Funder J.W. y Liu J.P. (2001). Dynamin II regulates hormone secretion in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* **276**: 4251-4260.
- Yasothornsrikul S., Greenbaum D., Medzihradzky K.F., Toneff T., Bunday R., Miller R., Schilling B., Petermann I., Dehnert J., Logvinova A., Goldsmith P., Neveu J.M., Lane W.S., Gibson B., Reinheckel T., Peters C., Bogoy M. y Hook V. (2003). Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9590-9595.

- Ye Y., Fujii M., Hirata A., Kawamukai M., Shimoda C. y Nakamura T. (2007). Geranylgeranyl diphosphate synthase in fission yeast is a heteromer of farnesyl diphosphate synthase (FPS), Fps1, and an FPS-like protein, Spo9, essential for sporulation. *Mol Biol Cell* **18**: 3568-3581.
- Yon L., Guillemot J., Montero-Hadjadje M., Grumolato L., Leprince J., Lefebvre H., Contesse V., Plouin P.F., Vaudry H. y Anouar Y. (2003). Identification of the secretogranin II-derived peptide EM66 in pheochromocytomas as a potential marker for discriminating benign versus malignant tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 2579-2585.
- Yoshida H., Kitagishi Y., Okumura N., Murakami M., Nishimura Y. y Matsuda S. (2011). How do you RUN on? *FEBS Lett* **585**: 1707-1710.
- Young P. y Suter U. (2003). The causes of Charcot-Marie-Tooth disease. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2547-2560.
- Yu H., Leaf D.S. y Moore H.P. (1993). Gene cloning and characterization of a GTP-binding Rab protein from mouse pituitary AtT-20 cells. *Gene* **132**: 273-278.
- Yu H. y Schreiber S.L. (1995). Structure of guanine-nucleotide-exchange factor human Mss4 and identification of its Rab-interacting surface. *Nature* **376**: 788-791.
- Zerial M. y McBride H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 107-117.
- Zhang L., Lai E., Teodoro T. y Volchuk A. (2009). GRP78, but Not Protein-disulfide Isomerase, Partially Reverses Hyperglycemia-induced Inhibition of Insulin Synthesis and Secretion in Pancreatic beta-Cells. *J Biol Chem* **284**: 5289-5298.
- Zhang X., Bi E., Novick P., Du L., Kozminski K.G., Lipschutz J.H. y Guo W. (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol Chem* **276**: 46745-46750.