

UNIVERSIDAD DE MURCIA



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
Y BIOLOGÍA MOLECULAR (A)**

**“ESTUDIO DE LAS PROTEINAS QUINASAS C CLÁSICAS
Y SU INTERACCION CON LIGANDOS Y MEMBRANAS”**

Por

ALEJANDRO TORRECILLAS SÁNCHEZ

MEMORIA

Presentada para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Murcia, Julio de 2003.



Facultad de Veterinaria

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A

Dr. D. JUAN CARMELO GÓMEZ FERNÁNDEZ, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A) y Dra. D^a. SENENA CORBALÁN GARCÍA, Investigadora del Programa “Ramón y Cajal” del mismo Departamento,

CERTIFICAMOS, que la memoria titulada “*Estudio de las Proteínas Quinasas C clásicas y su interacción con ligandos y membranas*”, presentada por Alejandro Torrecillas Sánchez para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Murcia, ha sido realizada bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A) de la Universidad de Murcia.

Revisado el texto, autorizamos su presentación para que pueda ser juzgada por el Tribunal correspondiente y firmamos la presente certificación a 1 de Julio de dos mil tres.

Fdo.: **Prof. Dr. D. Juan Carmelo Gómez Fernández**, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A) de la Universidad de Murcia.

Fdo.: **Dra. D^a. Senena Corbalán García**, Investigadora del Programa “Ramón y Cajal”. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A) de la Universidad de Murcia.



Facultad de Veterinaria

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A

El Consejo del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A), acordó en el día de la fecha, dar su visto bueno a la presentación de la Tesis Doctoral titulada “*Estudio de las Proteínas Quinasas C clásicas y su interacción con ligandos y membranas*”, presentada por Alejandro Torrecillas Sánchez, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Juan Carmelo Gómez Fernández, y de la Dra. D^a. Senena Corbalán García para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad de Murcia.

Murcia, a 1 de Julio de dos mil tres.

Fdo.: **Prof. Dr. D. Francisco Aranda Martínez**, Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (A) de la Universidad de Murcia.

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

A continuación, quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Fundación Séneca la confianza depositada al concederme la beca predoctoral de formación de personal investigador, sin la cual este trabajo no habría sido posible.

También quiero mostrar mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan C. Gómez Fernández y a la Dra. Senena Corbalán García, por brindarme la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral en este departamento, y en el fondo, por dejarme hacer lo que siempre he soñado. Sin vuestra perseverante y concienzuda orientación, esta Tesis Doctoral no sería una realidad.

También quisiera agradecer a los Dres. Aranda, Teruel, Ortiz, Fernández Belda y Soler, por su disponibilidad siempre que ha sido necesaria.

A mis compañeros de laboratorio Jose, Merry, Pablo, José Angel, M^a José y Susana quiero agradecerles la inestimable ayuda prestada en tantas ocasiones durante todos estos años, sin olvidar los buenos ratos que hemos disfrutado juntos. También quiero agradecer la ayuda y apoyo de antiguas compañeras, como Pilar, Isabel, Alicia e Isabel Fortea, que pasaron antes por este trago y que ya tomaron otros caminos. Asimismo, quiero hacer extensivo mi agradecimiento al resto de compañeros del departamento de Bioquímica y Biología Molecular “A” por el tiempo compartido con todos ellos. Y una mención especial para la nueva sangre del grupo, Consuelo, Andris y Sonia, que con mucho ánimo y esfuerzo todo es posible.

También quisiera reconocer la inestimable colaboración del Dr. Laynez Vallejo y de la Dra. Menéndez Fernández en la realización del Capítulo V de esta Memoria, sin olvidar la cálida acogida e inmejorable trato que me mostraron durante mis estancias en el Instituto de Química-Física “Rocasolano” del CSIC (Madrid). Fue poco el tiempo que pude compartir con el Dr. Laynez Vallejo, pero suficiente para

saber que nos ha dejado un gran científico y mejor persona. Estés donde estés, muchas gracias, Pepe.

Por otro lado quisiera agradecer al Dr. José Luis Rodríguez Arrondo sus valiosas aportaciones, sugerencias y comentarios sobre la espectroscopía de correlación bidimensional realizadas para la elaboración de los Capítulos VI y VII de esta Memoria.

Quisiera agradecer también la colaboración prestada por la Dra. Ana de Godos para los ensayos de resonancia magnética nuclear del Capítulo III de esta Tesis Doctoral. Asimismo, quisiera agradecer la ayuda (y amistad) de todo el equipo del Servicio de Cultivos del SACE (Antonia, Pepe, Juana y Dori), donde parte de este trabajo se llevó a cabo.

A mis padres, mis hermanos y mi Rocío quisiera agradecerles su cariño y su apoyo incondicional mostrado durante todos estos años, así como la confianza que han depositado en mí. Espero no haberles defraudado. De igual forma, quiero agradecer a mis otros padres y hermanos la atención y los cuidados prestados durante todo este tiempo. Y, por supuesto, quiero agradecer a Carmen los ánimos que siempre me ha dado para seguir adelante, sin dejar que me olvidase de la importancia real de las cosas. Muchas gracias, por estar ahí siempre y por aguantarlo todo, en especial, estos últimos meses. No te puedes imaginar el verdadero valor de tu apoyo. También quisiera agradecer a Lolita y, en especial, a Paco y María, por el interés mostrado durante tanto tiempo. Me hubiera gustado mucho que compartierais este momento conmigo, después de tantos años de lucha, para ver que todo esfuerzo tiene su recompensa final.

No puedo olvidarme de Manolo, Marisa, Víctor, Nuria, Javi y Raúl, amigos que han soportado los buenos y malos momentos de la realización de esta Tesis y con los que he compartido los acontecimientos más importantes de nuestras vidas.

Finalmente quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos familiares y amigos que han ido siguiendo el progreso de este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado gracias a las siguientes ayudas y proyectos de investigación:

- Beca de Formación de Personal Investigador. Fundación Séneca (Centro de Coordinación de la Investigación). Región de Murcia. 1998-2002.
- Ayudas para estancias cortas en centros distintos al de aplicación de la beca. Fundación Séneca (Centro de Coordinación de la Investigación). Región de Murcia. Mayo 2001, Julio 2002.
- Proyecto: "Estructura y dinámica de lípidos y proteínas de membranas. Elementos implicado en la transmisión de señales". DGEIC (Ministerio de Educación y Cultura). 1996-1999. Investigador principal: Dr. Juan Carmelo Gómez Fernández.
- Proyecto: "Ayudas a grupos consolidados y de alto rendimiento". Fundación Séneca (Centro de Coordinación de la Investigación). Región de Murcia. 1999. Investigador principal: Dr. Juan Carmelo Gómez Fernández.
- Proyecto: "Bioquímica y Biología Molecular de la Interacción lípido-proteína en la señalización a través de membranas". DGEIC (Ministerio de Educación y Cultura). 1999-2002. Investigador principal: Dr. Juan Carmelo Gómez Fernández.
- Proyecto: "Ayudas a grupos consolidados y de alto rendimiento". Fundación Séneca (Centro de Coordinación de la Investigación). Región de Murcia. 2000. Investigador principal: Dr. Juan Carmelo Gómez Fernández.
- Proyecto: "Interacción lípido-proteína: Estudio de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y su interacción con membranas". Fundación Séneca (Centro de Coordinación de la Investigación). Región de Murcia. 2002-2004. Investigador principal: Dr. Juan Carmelo Gómez Fernández.

Los resultados mostrados en la presente Memoria han sido recogidos, total o parcialmente, para su publicación de la siguiente manera:

- "Activation of Protein Kinase C α by lipid mixtures containing different proportions of diacylglycerols". A. Torrecillas, S. Corbalán-García, A. De Godos, J.C. Gómez-Fernández. *Biochemistry* (2001), 40, 15038-15046.
- "C2 Domains of Protein Kinase C isoforms α , β and γ : activation parameters and calcium stoichiometries of the membrane-bound state". S. Kuhout, A. Torrecillas, S. Corbalán-García, J.C. Gómez-Fernández, J. Falke. *Biochemistry* (2002), 41, 11411-11424.
- "Retinoic Acid binds to the C2 domain of Protein Kinase C α ". W. F. Ochoa, N. Verdaguer, A. Torrecillas, S. Corbalán-García, J.C. Gómez-Fernández, I. Fita. *Biochemistry* (2003), aceptado y pendiente de publicación.
- "Structural study of the C2 domains of the classical PKC isoenzymes using infrared spectroscopy and two-dimensional infrared correlation spectroscopy". A. Torrecillas, S. Corbalán-García, J.C. Gómez-Fernández, J. C. Enviado y pendiente de aceptación.
- "An infrared spectroscopic study of the secondary structure of the Protein Kinase C α and the protection of Ca $^{2+}$ on thermal denaturation". A. Torrecillas, S. Corbalán-García, J.C. Gómez-Fernández. Enviado y pendiente de aceptación.
- "A calorimetric study of the interaction of C2 Domains of the classical PKC isoenzymes with Ca $^{2+}$ and phospholipids". A. Torrecillas, J. Laynez, M. Menéndez, S. Corbalán-García, J.C. Gómez-Fernández. En preparación.

A mi familia

A Carmen

Índice

ABREVIATURAS

CAPÍTULO I. Introducción y Objetivos.

1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS	3
2. SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA	6
2.1. Vesículas fosfolipídicas	6
2.2. Polimorfismo lipídico	8
2.2.1. Fases lipídicas	9
2.2.2. Forma y curvatura de los lípidos	10
2.2.3. Estudios sobre los lípidos.....	12
3. LA PROTEÍNA QUINASA C	12
3.1. Isoenzimas de la PKC.....	14
3.2. Dominios conservados de las PKCs	17
3.2.1. Dominio pseudosustrato	17
3.2.2. Dominio C1	19
3.2.3. Dominio C2	23
3.2.3.1. Estructura de los dominios C2	25
3.2.3.2. Sitio de unión de Ca^{2+} en los dominios C2	27
3.2.4. Región catalítica	34
3.2.5. Regiones variables	36
3.3. Regulación de la PKC	37
3.3.1. Regulación por cofactores lipídicos	37
3.3.1.1. Diacilglicerol y ésteres de forbol	38
3.3.1.2. Lípidos aniónicos y Ca^{2+}	40
3.3.1.3. Otros compuestos lipídicos	42
3.3.1.4. Propiedades de la membrana	44
3.3.2. Regulación por fosforilación	46
3.3.3. Regulación por localización	48
3.3.4. Modelo de activación de la PKC	50
3.4. Función de la PKC	52
4. OBJETIVOS	56

CAPÍTULO II. Técnicas y Métodos generales.

1. TÉCNICAS	61
1.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	61
1.1.1. Calorimetría diferencial de barrido de lípidos	62
1.1.2. Calorimetría diferencial de barrido de proteínas	64
1.2. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	67
1.2.1. Ecuaciones utilizadas para el ajuste de los datos de ITC	71
1.2.1.1. <i>Consideraciones generales</i>	71
1.2.1.2. <i>Modelo de unión a un tipo único de sitios idénticos</i>	72
1.2.1.3. <i>Modelo de unión a dos tipos de sitios independientes</i>	75
1.2.1.4. <i>Modelo de unión a sitios secuenciales</i>	76
1.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)	78
1.3.1. Resonancia magnética nuclear de ^{31}P	80
1.4. Espectroscopía de infrarrojo	82
1.4.1. Grupos vibracionales de fosfolípidos	84
1.4.2. Modos vibracionales en péptidos y proteínas	86
1.4.2.1. <i>Obtención de los espectros de infrarrojo y tratamiento de los datos</i>	90
1.4.2.2. <i>Espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional (2D-IR)</i>	94
1.4.2.2.1. <i>Espectroscopía bidimensional basada en una perturbación</i>	94
1.4.2.2.2. <i>Análisis de correlación bidimensional</i>	95
1.4.2.2.3. <i>Propiedades de los espectros de correlación bidimensional</i>	99
1.5. Espectroscopía de fluorescencia	102
1.5.1. Fluorescencia intrínseca	103
1.5.2. Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET)	104
2. MÉTODOS GENERALES	107
2.1. Obtención del dominio C2 de la PKC α , β II y γ	107
2.1.1. Construcción de los plásmidos de expresión	107

2.1.2. Expresión y purificación de los dominios 6×His-C2 de la PKC α , β II y γ	110
2.2. Cultivo de células	114
2.2.1. Cultivo de células de mamífero	114
2.2.2. Cultivo de células de insecto	114
2.3. Obtención de la PKC α completa	114
2.3.1. En células de mamífero HEK293	115
2.3.1.1. <i>Construcción de los plásmidos de expresión</i>	115
2.3.1.2. <i>Transfección con ADN plasmídico</i>	115
2.3.1.3. <i>Obtención de la proteína de los lisados celulares</i>	116
2.3.2. En células de insecto Sf9	116
2.3.2.1. <i>Obtención del baculovirus recombinante</i>	116
2.3.2.2. <i>Purificación de la proteína</i>	121
2.4. Determinación de la concentración de proteína	126
2.5. Electroforesis	126
2.6. Tinción de los geles de electroforesis	127
2.6.1. Tinción de plata	127
2.6.2. Tinción con azul de Coomassie	127
2.7. Electrotransferencia	128
2.8. Determinación de la concentración de lípido.....	129
2.8.1. Determinación de la concentración de fosfolípido	129
2.8.2. Determinación de la concentración de diacilglicerol	129
2.9. Preparación de vesículas fosfolipídicas	130
2.9.1. Vesículas multilamelares (MLV)	130
2.9.2. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV).....	130
2.9.3. Vesículas unilamelares grandes (LUV).....	130
2.9.4. Micelas de Triton X-100.....	131
2.10. Determinación de la actividad quinasa	131
2.11. Ensayo de enlace a fosfolípido	132
2.11.1. Ensayos de enlace a vesículas multilamelares	132
2.11.2. Ensayos de enlace a vesículas unilamelares grandes cargadas con sacarosa	133
2.12. Ensayos de filtración en gel con los dominios C2 de las PKCs clásicas	134

CAPÍTULO III. Activación de la PKC α mediante diferentes proporciones de diacilgliceroles.

1. RESUMEN	139
2. INTRODUCCIÓN	140
3. RESULTADOS	142
3.1. Estudios térmicos de las mezclas lipídicas	142
3.2. Medidas de transición de fase mediante espectroscopía de infrarrojo	145
3.3. Espectroscopía de ^{31}P -RMN	147
3.4. Diagrama de fases del sistema POPC/POPS/DPG	150
3.5. Activación y enlace a membranas de la PKC α tipo silvestre y mutante D246/248N en función de la concentración de diacilglicerol	152
4. DISCUSIÓN	159

CAPÍTULO IV. Parámetros de activación de los dominios C2 de la PKC α , βII y γ .

1. RESUMEN	167
2. INTRODUCCIÓN	168
3. RESULTADOS	173
3.1. Unión de Ca^{2+} a los dominios C2 en ausencia de membranas	173
3.2. Unión de Ca^{2+} a los dominios C2 en presencia de membranas	175
3.3. Unión de lípidos a los dominios C2 en presencia de Ca^{2+}	177
4. DISCUSIÓN	181
4.1. Análisis comparativo de la secuencia primaria de aminoácidos y de la estructura tridimensional	182
4.2. Afinidades y cooperatividad en la unión a Ca^{2+}	184

4.3. Afinidades y cooperatividad en la unión a membranas	186
4.4. Implicaciones para la señalización <i>in vivo</i> de la PKC	186

CAPÍTULO V. Análisis calorimétrico de los dominios C2 de la PKC α , β II y γ .

1. RESUMEN	191
2. INTRODUCCIÓN	192
3. RESULTADOS	194
3.1. Análisis de ITC	194
3.1.1. Valoración de la unión de Ca ²⁺	194
3.1.2. Valoración del enlace a fosfolípidos	198
3.2. Análisis mediante DSC	202
3.2.1. Efecto del Ca ²⁺ sobre la desnaturalización térmica de los dominios C2	202
3.2.2. Efecto de la presencia de Ca ²⁺ y fosfolípidos sobre la desnaturalización térmica de los dominios C2.....	208
3.2.3. Análisis del efecto del Ca ²⁺ y fosfolípidos sobre la desnaturalización térmica de los dominios C2	213
3.2.3.1. Dependencia de T_m con la concentración de Ca ²⁺	213
3.2.3.2. Representaciones de van't Hoff	216
3.2.3.3. Dependencia de la variación de ΔH_d con la variación de T_m	218
4. DISCUSIÓN	223

CAPÍTULO VI. Análisis de la estructura secundaria de los dominios C2 de la PKC α , β II y γ .

1. RESUMEN	231
------------------	-----

2. INTRODUCCIÓN	232
3. RESULTADOS	234
3.1. Estudio de la estructura secundaria mediante FT-IR	234
3.1.1. Estructura secundaria en ausencia de ligandos	234
3.1.2. Estructura secundaria en presencia de Ca^{2+}	239
3.1.2.1. Estructura secundaria en presencia de Ca^{2+} a 25°C	239
3.1.2.2. Estructura secundaria en presencia de Ca^{2+} a 80°C	240
3.1.3. Estructura secundaria en presencia de fosfolípidos y Ca^{2+}	246
3.1.4. Estabilidad térmica de los dominios C2	251
3.2. Estudios de espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional	254
3.2.1. Correlación bidimensional síncrona	254
3.2.2. Correlación bidimensional asíncrona	257
4. DISCUSIÓN	260

CAPÍTULO VII. Estructura secundaria de la PKC α e interacción con diferentes ligandos.

1. RESUMEN	267
2. INTRODUCCIÓN	268
3. RESULTADOS	270
3.1. Estudio de la estructura secundaria mediante FT-IR	270
3.1.1. Estructura secundaria de la PKC α a 20°C	270
3.1.2. Estructura secundaria de la PKC α a 75°C	274
3.1.3. Estudio de la desnaturalización térmica de la PKC α	277
3.2. Estudios de espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional	281
3.2.1. Correlación bidimensional síncrona	281
3.2.2. Correlación bidimensional asíncrona	283

4. DISCUSIÓN.....	286
-------------------	-----

CAPÍTULO VIII. Discusión General y Conclusiones.

1. DISCUSIÓN GENERAL.....	293
---------------------------	-----

2. CONCLUSIONES.....	299
----------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA.....	305
--------------------------	------------

Capítulo I

Introducción y Objetivos.

1. MEMBRANAS BIOLÓGICAS.

La membrana plasmática y el resto de membranas celulares cumplen un papel muy importante para la vida y supervivencia de las células. Entre otras funciones, las membranas biológicas no sólo suponen una barrera física altamente selectiva con el medio externo, sino que también permite el intercambio de energía, materia e información entre las células y el medio que las rodea. Además, otras membranas separan el interior celular en compartimentos u orgánulos (en eucariotas, el núcleo, las mitocondrias, los cloroplastos, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, entre otros) y constituyen el medio óptimo para la actividad de diversas proteínas, como enzimas, receptores, canales y sistemas de transporte que controlan el flujo de nutrientes, productos de desecho e iones hacia el interior y exterior celular (McElhaney, 1975; Haydon, 1975; Quinn y Chapman, 1980). A nivel de la membrana tienen lugar multitud de procesos bioquímicos vitales, como por ejemplo el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa en la membrana mitocondrial interna, la fotosíntesis en las membranas internas de los cloroplastos, los impulsos nerviosos que se transmiten a través de las membranas de las células nerviosas o la comunicación intercelular que tiene lugar mediante la interacción de ciertos ligandos con los receptores de membrana de las células diana.

Las membranas biológicas poseen una unidad estructural donde los lípidos, las proteínas y los carbohidratos que forman parte de la misma se disponen asimétricamente (Op den Kamp, 1979). Las moléculas lipídicas tienen la capacidad de moverse lateralmente en las membranas biológicas, lo cual proporciona fluidez y flexibilidad a la misma (Singer y Nicholson, 1972; Chapman, 1975). La unidad estructural de la membrana es la bicapa lipídica y su composición puede variar entre células diferentes e incluso entre los distintos compartimentos u orgánulos en una misma célula. Además la capa interna y externa de las membranas tienen una composición diferente (Figura I.1).

Los componentes básicos de las membranas biológicas son los *lípidos*, las *proteínas* y los *carbohidratos*. Los lípidos junto con las proteínas constituyen la casi totalidad de la masa de las membranas biológicas. Las moléculas lipídicas y proteicas que constituyen la membrana se mantienen unidas por interacciones no covalentes de

carácter cooperativo. Los carbohidratos se encuentran unidos a los lípidos y proteínas de la membrana de forma covalente (Kinnunen y col., 1994).

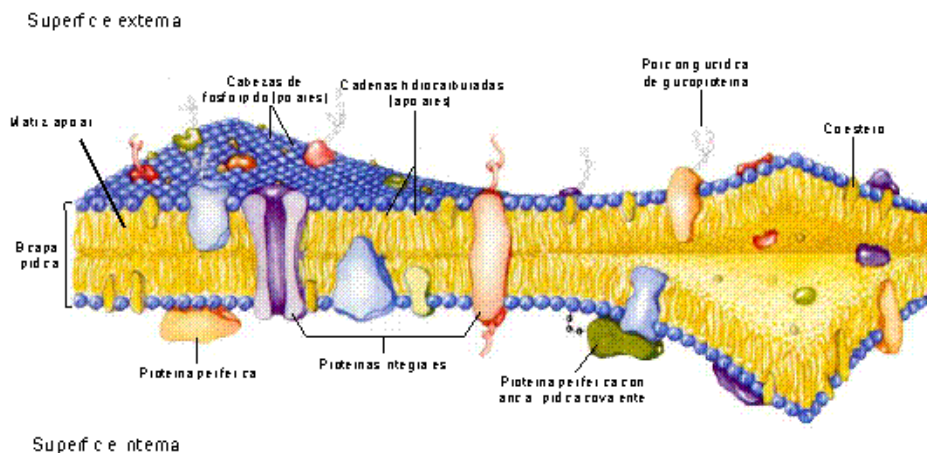


Figura I.1. Modelo estructural de mosaico fluido de una membrana biológica. Se pueden observar los distintos componentes de la membrana como son los lípidos, las proteínas y los glúcidos. En el caso de la membrana plasmática, la superficie externa de la bicapa se encuentra en contacto con el medio extracelular, mientras que la superficie interna da hacia el citoplasma. En el caso de las membranas de los orgánulos celulares, la superficie externa de la bicapa contacta con el citoplasma, mientras que la superficie interna lo hace con la matriz o medio interno de los mismos. El interior de la membrana es una región hidrofóbica fluida formada por las cadenas laterales hidrocarbonadas de los fosfolípidos. Las proteínas pueden ser integrales o periféricas. Las primeras se mantienen mediante interacciones hidrofóbicas con sus cadenas laterales de aminoácidos polares, mientras que las segundas se fijan a la superficie de la membrana mediante interacciones más débiles. Tanto las proteínas como los lípidos de la membrana se pueden mover lateralmente en el plano de la bicapa. Las moléculas de glúcido se unen a algunas proteínas y lípidos y quedan expuestas en la superficie extracelular de la membrana. Tomada de Lehninger y col. (1993).

Los principales *lípidos de la membrana* son los fosfolípidos, los esfingolípidos y el colesterol (Quinn y Chapman, 1980). Los *fosfolípidos* son los que se encuentran en mayor proporción y diversidad (Dowhan, 1997). Poseen una cabeza polar o hidrofílica y dos regiones hidrocarbonadas apolares o hidrofóbicas. A diferencia de los fosfolípidos, los *esfingolípidos* derivan de la esfingosina y no del glicerol. La esfingomiélinea es el principal representante de este grupo (Barenholz y Thompson, 1999). El *colesterol* se distribuye de forma no uniforme en la membrana y tiende a alterar la regularidad de la estructura de la misma, ocasionando un incremento en el orden de los fosfolípidos de la bicapa cuando se encuentra ésta en estado fluido y produciendo desorden cuando se encuentra en estado rígido, aunque también puede ocasionar cambios en la permeabilidad y estabilidad de la membrana

(Chapman y Penkett, 1966; Oldfield y Chapman, 1972; Villalain y Gómez-Fernández, 1992; Robinson y col., 1995; Mitchell y col., 1998; Bhattacharya y Haldar, 2000). La forma y la naturaleza anfipática de las moléculas lipídicas es la causante de que, espontáneamente, se formen bicapas en solución acuosa, en las que las cabezas polares se encuentran dirigidas hacia el exterior y las colas no polares o hidrofóbicas, hacia el interior.

Las *proteínas* se encuentran intercaladas en la bicapa lipídica y tienen funciones muy variadas, como la de ser transportadores, receptores y transductores de energía entre otras. La diversidad y especialización funcional de las proteínas de membrana queda reflejada en la variable composición y proporción de lípidos y proteínas en las diferentes membranas y organismos celulares. Las proteínas de la membrana se clasifican según su relación o asociación con la misma en *proteínas intrínsecas o integrales* y en *proteínas extrínsecas o periféricas*. Las primeras se mantienen unidas a las membranas con gran fuerza, mediante interacciones de tipo hidrofóbico, y para separarlas es preciso aplicar agentes agresivos para la membrana, como por ejemplo disolventes orgánicos, detergentes o agentes caotrópicos (Liszewski y Atkinson, 1992; Lee, 1998). Por otro lado, las *proteínas extrínsecas o periféricas* se asocian a la membrana fijándose a su superficie y establecen con la misma interacciones débiles, de tipo electrostático y/o por puentes de hidrógeno (Kinnunen y col., 1992). Pueden disociarse de la membrana mediante agentes o procesos que no afectan a la misma, como agentes quelantes, cambios de pH o soluciones salinas de alta fuerza iónica. Las proteínas extrínsecas o periféricas pueden asociarse a la membrana de diferente manera: a través de proteínas integrales (Harrison, 1996), mediante interacciones con lípidos de la membrana, como ocurre con la proteína quinasa C (Newton, 1993), o bien a través de modificaciones lipídicas en su estructura que les permite el anclaje a la membrana, como es el caso de la proteína ras (Magee, 1999).

Los *carbohidratos* o *glúcidos* se encuentran localizados en la superficie externa de la membrana, unidos a algunos lípidos y proteínas. Aunque el porcentaje de *carbohidratos* asociados a la membrana es bajo (menor del 10%), estos compuestos son muy importantes desde el punto de vista funcional pues la mayoría de las moléculas implicadas en funciones de reconocimiento son glicolípidos (West, 1986; Lemieux y Bertozzi, 1998; Evans y Roger MacKenzie, 1999). También es

posible que se encuentren implicados en funciones de protección de la célula frente a condiciones extremas, como pH bajo o enzimas de degradación.

2. SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA.

Las membranas biológicas constituyen unos sistemas muy complejos tanto a nivel de su estructura como de su función. Para poder estudiar y explicar las propiedades de las membranas es preciso poder conocer el comportamiento fisico-químico de la unidad estructural de la membrana, es decir, de la bicapa lipídica. Para ello, se han utilizado sistemas modelo de membrana, también llamados vesículas o liposomas (Bangham y col., 1965; Mayer y col., 1986b), con los que se ha podido estudiar el efecto de uno o varios tipos de lípidos en la estructura de la membrana y su influencia sobre la función de ciertas proteínas.

2.1. Vesículas fosfolipídicas.

Las vesículas son asociaciones coloidales de lípidos organizadas en estructuras cerradas. Estas vesículas se pueden preparar a partir de mezclas de lípidos naturales extraídos o purificados, o bien lípidos sintéticos (Bangham y col., 1965). Existen cuatro grandes tipos de vesículas lipídicas que se obtienen mediante diferentes técnicas (Mayer y col., 1986b): las *vesículas multilamelares grandes* (MLV), las *vesículas unilamelares grandes* (LUV), las *vesículas unilamelares pequeñas* (SUV) y las *micelas* (Figura I.2).

- a) Los sistemas modelo de membrana más simples son las *vesículas multilamelares grandes*, las cuales están compuestas por una serie de bicapas concéntricas separadas entre sí por estrechos espacios acuosos (Bangham y col., 1965). Se obtienen por resuspensión directa de la mezcla de lípidos en el tampón acuoso. Estas vesículas presentan un tamaño variable, entre 0,1-10 μm , y se suelen emplear en estudios físicos sobre la organización de la bicapa y las propiedades del movimiento de los lípidos en la misma. Debido a que sólo el 10% del lípido total se halla en la bicapa más externa de este tipo de vesículas, se descarta su uso para otros tipos de análisis.

- b) Las *vesículas unilamelares grandes (LUV)* se obtienen a partir de las anteriores mediante un proceso de extrusión rápida a través de filtros de policarbonato de diferente diámetro. Si se utilizan filtros de 100 nm, se obtienen vesículas con un tamaño entre 60-100 nm (Mayer y col., 1986a). Las LUV poseen prácticamente la misma distribución de lípidos en las monocapas interna y externa.
- c) Las *vesículas unilamelares pequeñas (SUV)* se pueden formar mediante ultrasonidos a partir de las multilamelares grandes (Huang, 1969). Presentan un diámetro entre 25-40 nm. Dado que poseen un radio de curvatura muy pequeño, la relación entre la cantidad de lípido en la monocapa externa y en la interna puede llegar a ser mayor de 2:1. Debido a esta alta curvatura, las restricciones de empaquetamiento de los lípidos perturban sus propiedades físicas en comparación con sistemas menos curvados, por lo se descarta el uso de este tipo de vesículas para estudios físicos de las propiedades de los lípidos de la membrana.

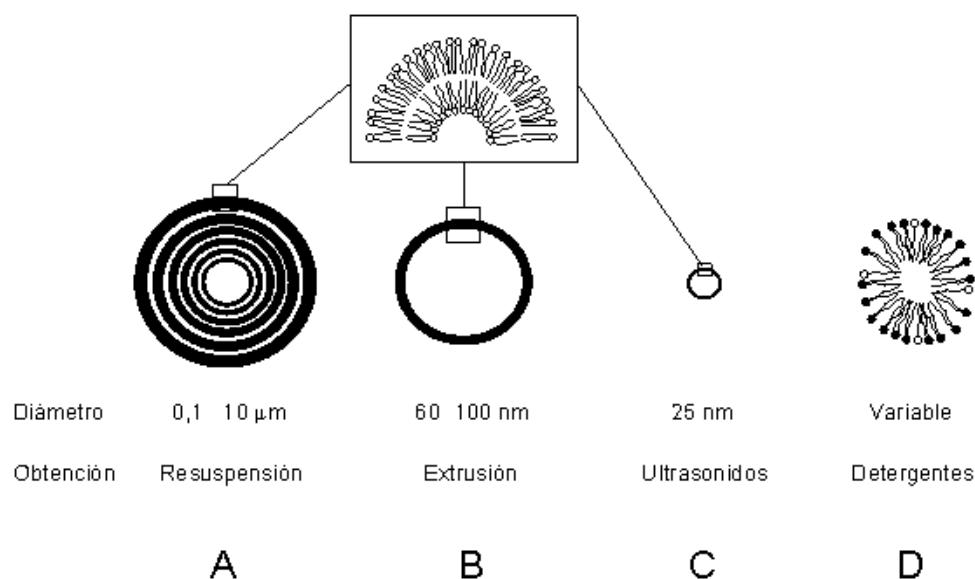


Figura 1.2. Tipos de vesículas lipídicas. Se muestran los distintos tipos de vesículas lipídicas que se pueden obtener, junto con su tamaño y método de obtención. (A) Vesículas multilamelares grandes (MLV), (B) vesículas unilamelares grandes (LUV), (C) vesículas unilamelares pequeñas (SUV) y (D) micelas, donde el fosfolípido se muestra en negro y el detergente en blanco.

- d) Las *micelas* se caracterizan por ser agregaciones lipídicas donde las regiones hidrofóbicas quedan enfrentadas y alejadas del medio hidrofílico que las rodea.

Se pueden obtener tras resuspender la mezcla lipídica en un detergente. Pueden tener tamaños variables dependiendo del lípido y del detergente utilizado. Los detergentes utilizados para solubilizar lípidos o incluso membranas biológicas pueden ser de diferente naturaleza y entre ellos destacan el dodecil sulfato sódico (SDS), el Tritón X-100 o derivados del polietilenglicol.

2.2. Polimorfismo lipídico.

El polimorfismo lipídico es una propiedad característica de los lípidos que les permite organizarse en diferentes estructuras o fases cuando se encuentran en medio acuoso (Luzzati, 1968; Cullis y De Kruijff, 1979; Cullis y col., 1986; Seddon, 1990a; Seddon, 1990b; De Kruijff, 1997). La fase lipídica resultante depende de la forma molecular de los lípidos, de su concentración en agua y de la temperatura. De esta manera, los fosfolípidos presentan mesomorfismo liotrópico y termotrópico, es decir, diferentes tipos de fases en función de la cantidad de agua y de la temperatura, respectivamente. Por otro lado, cabe destacar también el hecho de que algunos péptidos y proteínas interactúan con la membrana y afectan al polimorfismo lipídico (Zidovetzki y col., 1988; De Boeck y Zidovetzki, 1988; Epan, 1998).

La importancia biológica del polimorfismo lipídico se debe a que influye de manera significativa sobre procesos tan diversos como la formación de vesículas durante la división celular (de Kruijff, 1997), la fusión de membranas (Luzzati, 1997; Siegel, 1999; Kinnunen y Holopainen, 2000), el tráfico de proteínas mediado por vesículas (Crawford, 1996), la formación de dominios de composición diferente al resto de la bicapa (Edidin, 1997; Brown, 1998), la inclusión de componentes no lipídicos en la bicapa (Batenburg y de Kruijff, 1988), el movimiento lateral y transversal de macromoléculas a través de la membrana (Nikolay y col., 1985), la estabilización de complejos proteicos de membrana (Sadhale y Shah, 1999) y las interconversiones conformacionales necesarias para la función de una proteína (Schwarz y col., 1997; Gofí y Alonso, 1999). Fruto de esta regulación enzimática se pueden activar diferentes rutas de señalización celular (Slater y col., 1994) que controlan la expresión de diversos genes (Vigh y col., 1998).

2.2.1. Fases lipídicas.

Las *fases lipídicas* se pueden clasificar según el tipo de red u organización de largo alcance (lamelar o hexagonal, entre otras), según el orden de las cadenas (fluidas o extendidas) y según la curvatura de la fase (normal o inversa). La nomenclatura más habitual es la propuesta por Luzzati (1968). Según este autor, en primer lugar una letra latina mayúscula indica el *tipo de organización de largo alcance*. Así, por ejemplo, L significa unidimensional (lamelar), H es bidimensional (hexagonal), P es bidimensional oblicua, Q es tridimensional cúbica y C es tridimensional cristalina. A continuación, la *conformación* que adoptan las cadenas hidrocarbурadas se indica mediante un subíndice griego, de forma que α significa conformación desordenada (fluido), β significa conformación ordenadas (gel) y β' significa conformación ordenada e inclinada (gel). Además, la organización lipídica puede ser de tipo I, cuando los elementos estructurales están rellenos con las cadenas hidrocarbурadas e incluidos en una matriz polar, o de tipo II (invertidas) cuando el disolvente acuoso está rodeado por una matriz hidrofóbica.

Las estructuras lipídicas de mayor relevancia son la *fase lamelar*, la *fase hexagonal* y la *fase cúbica* (Figura I.3). Las *fases lamelares o bicapas* (L) son estructuras periódicas en una dimensión. Esta *fase lamelar* cuando se encuentra en estado *gel* presenta rigidez en las cadenas acílicas de los lípidos, las cuales poseen configuración *todo-trans*, están empaquetadas en una red bidimensional cuasi-hexagonal y presentan el movimiento rotacional sobre su eje longitudinal bastante limitado (Marsh, 1980). Las cadenas acílicas pueden disponerse paralelas a la normal de la bicapa (L_{β}), inclinadas ($L_{\beta'}$) o interdigitadas ($L_{\beta I}$). En la *fase lamelar fluida, cristal-líquido o líquido-desordenada* (L_{α}) las cadenas acílicas están muy desordenadas respecto a la fase gel, predominando el conformero *gauche* y las moléculas difunden en el plano de la bicapa con mayor rapidez. El área interfacial por molécula se incrementa a pesar de que disminuye la anchura de la bicapa y también la densidad.

La *fase hexagonal* (H) es una estructura fluida periódica en dos dimensiones que consiste en cilindros paralelos empaquetados hexagonalmente y con una longitud infinita. Pueden tener dos topologías, normal (H_I) o inversa (H_{II}).

Finalmente, las *fases cúbicas* son estructuras periódicas en tres dimensiones (Q) que pueden ser bicontinuas o discontinuas según la continuidad de la porción lipídica o de la acuosa a lo largo de la red tridimensional.

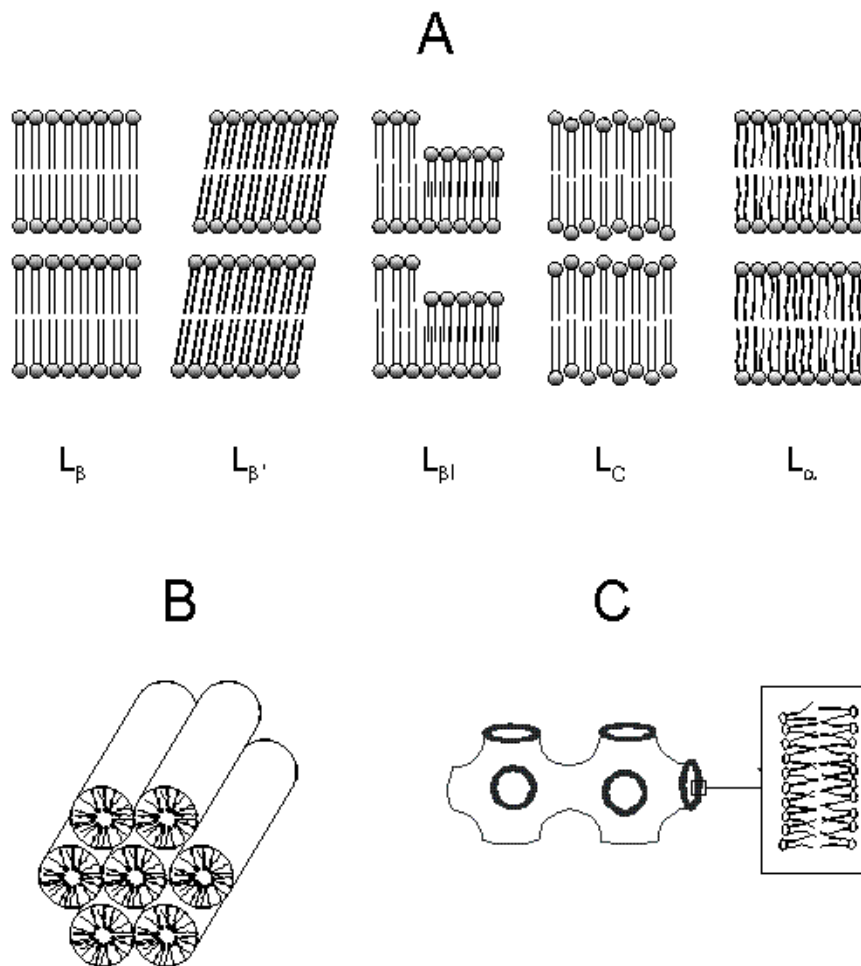


Figura 13. Disposición molecular propuesta para las diferentes fases lipídicas. Se muestran las fases lamelares (A) (L_{β} y $L_{\beta'}$, fase gel; L_{α} fase cristalina, L_{α} fase liquido-cristalina), la fase hexagonal (H_{II}) (B) y la fase cúbica (C).

2.2.2. Forma y curvatura de los lípidos.

La *forma* de los lípidos es una característica que refleja, entre otros, los efectos del tamaño de las regiones polar y apolar del lípido, la hidratación y la carga de la cabeza polar y la formación de enlaces de hidrógeno. Este parámetro determina la estructura adoptada por el lípido (Israelachvili y col., 1980). Existe una relación evidente entre la forma del lípido y la geometría del agregado lipídico macroscópico,

ya que se deben satisfacer las restricciones del empaquetamiento. De esta manera, los lípidos con forma de cono invertido tenderían a formar fases micelares (de tipo I), mientras que los lípidos con forma cilíndrica formarían fases lamelares y los lípidos con forma de cono adoptarían fases no lamelares invertidas (de tipo II) (figura I.4).

Por otro lado, la *curvatura* es un parámetro que define las propiedades polimórficas del lípido (Gruner, 1989; Seddon, 1990a; Seddon, 1990b). El estado del lípido depende de dos fuerzas contrapuestas: la tendencia de la monocapa lipídica para formar una interfase lípido-agua curvada y las restricciones impuestas por el empaquetamiento de la cadena hidrocarbonada que previenen esa curvatura. Las curvaturas se consideran positivas cuando la monocapa forma una superficie convexa hacia el agua y negativas cuando esa superficie es cóncava (Helfrich, 1973).

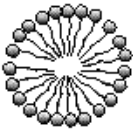

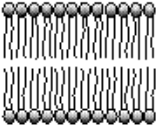

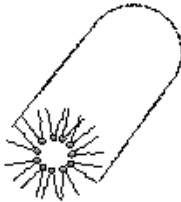
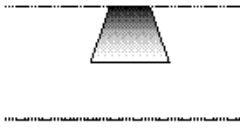
LÍPIDO	FASE	FORMA MOLECULAR
Lisofosfolípidos Detergentes	 Micelar	 Cono invertido
Fosfatidilcolina Esfingomielina Fosfatidilserina Fosfatidilinositol Fosfatidilglicerol Ácido Fosfatídico Cardiolipina	 Bicapa	 Cilindro
Fosfatidiletanolamina (insaturada) Cardiolipina Ca^{2+} Ácido Fosfatídico Ca^{2+} (pH<6.0) Ácido Fosfatídico (pH<3.0) Fosfatidilserina (pH<4.0)	 Hexagonal (H)	 Cono

Figura I.4. Fases polimórficas y formas moleculares de los lípidos. Se muestran las distintas fases lipídicas y las correspondientes formas moleculares que adoptan de los lípidos. A su vez, a la izquierda, se citan ejemplos de cada caso.

2.2.3. Estudios sobre los lípidos.

Las *transiciones entre fases* pueden suceder al variar la temperatura del sistema. Manteniendo la temperatura constante, las transiciones de fase se pueden inducir por factores ambientales tales como la fuerza iónica o el pH. El estudio de estas transiciones de fase resulta muy interesante porque aporta información referente a las separaciones laterales de fases o a la interacción entre los componentes de la membrana. Generalmente, se emplea la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para el estudio de la termodinámica y de las temperaturas de transición de fase. La difracción de rayos X y la microscopía electrónica se utiliza para el estudio de los cambios en la estructura y en las dimensiones de las vesículas lipídicas. Las técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), son útiles también para los estudios de transición entre fases y de los cambios en la dinámica lipídica. Finalmente, la resonancia magnética nuclear (RMN) permite conocer el estado en que se encuentra la mezcla lipídica en estudio.

El conocimiento de las propiedades estructurales de los lípidos, así como de los factores que regulan su polimorfismo y las transiciones de fase puede ayudarnos a comprender diversos fenómenos biológicos muy importantes, como se comentó anteriormente.

3. LA PROTEÍNA QUINASA C.

La proteína quinasa C (PKC) constituye una familia de quinasas que fosforilan diversas proteínas específicamente en residuos de serina y treonina y que participan en multitud de vías de transmisión de señales en las células, cuya finalidad última será la activación de determinados factores de transcripción a nivel del núcleo celular o bien la regulación del citoesqueleto celular. Se identificaron por primera vez en 1977 como una quinasa citoplasmática activada por calcio y regulada por fosfolípidos (Inoue y col., 1977). La PKC es una enzima anfitrópica, es decir, que puede existir en forma soluble en el citosol y en forma unida a la membrana. Está implicada en multitud de funciones fisiológicas, ya que participa en mecanismos de señalización que conducen a la mitogénesis y proliferación celular, en la apoptosis,

en la activación plaquetaria, en el reordenamiento del citoesqueleto de actina, en la modulación de canales iónicos y en la secreción (Kaibuchi y col., 1983; Nishizuka, 1984; de Riemer y col., 1985; Bell, 1986; Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1988; Nishizuka, 1992; Dekker y Parker, 1994; Zhang y col., 1997).

La activación de la PKC se desencadena por diversos compuestos, como por ejemplo factores de crecimiento, hormonas y otras señales extracelulares recogidas por distintos receptores, a través fundamentalmente de la activación de la fosfolipasa C, la cual hidroliza fosfolípidos de membrana como el fosfatidilinositol y produce los segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trisfosfato (Nishizuka, 1988). Los niveles de DAG en la membrana sufren una elevación transitoria debido a la acción de la fosfolipasa C (Nishizuka, 1995). Así, mientras el DAG queda asociado a la membrana, el inositol trisfosfato es soluble y se libera al citosol, donde provoca el aumento de la concentración de calcio, lo cual afecta a numerosos procesos intracelulares, entre otros la migración de la PKC hasta la membrana para ser activada por el DAG. Precisamente, algunas PKC se han identificado como una de las principales dianas del DAG, de forma que se activan cuando interaccionan con este compuesto (Newton, 1993). Por otro lado, el descubrimiento de que algunas PKC son también receptores de alta afinidad para ésteres de forbol (Castagna y col., 1982), los cuales son moléculas promotoras de tumores (Ashendel, 1985), ha establecido su implicación en los procesos de carcinogénesis y también ha proporcionado herramientas farmacológicas con las que manipular las PKC tanto *in vitro* como en sistemas celulares (Blumberg, 1988). Esto pone de manifiesto la función tan importante que desempeña la PKC en los mecanismos de señalización celular y, a su vez, la relevancia del estudio de esta proteína en relación a poder controlar estos procesos.

Para poder determinar la función de la PKC se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la base molecular de su activación y regulación. De esta manera, se sabe que existen distintos elementos o factores implicados en la regulación de la actividad enzimática de esta proteína como, por ejemplo, diversos cofactores lipídicos (DAG, fosfolípidos aniónicos, entre otros), el ión calcio, el estado de fosforilación de la enzima, así como su localización celular (Keranen y col., 1995; Ron y Kazaniet, 1999; Dempsey y col., 2000; Newton, 2001). El campo de investigación de la PKC se ha ampliado enormemente en los últimos años, debido

principalmente a la diversidad propia de esta familia de proteínas (con numerosas isoenzimas distintas que además presentan importantes diferencias estructurales en su región reguladora), y al hecho de que presenten una distribución heterogénea en los tejidos celulares, de forma que pueden activarse mediante distintos mediadores y fosforilar así a sustratos específicos en determinadas localizaciones celulares concretas (Nishizuka, 1995; Newton y Johnson, 1998). El análisis de la estructura y función de los distintos dominios aislados que componen la PKC, en especial los dominios de la región reguladora, constituye uno de los campos de investigación más desarrollados en la actualidad para el estudio del mecanismo de activación de estas enzimas.

3.1. Isoenzimas de la PKC.

Las PKCs constituyen una gran familia de isoenzimas, cada una de las cuales presenta distintas características y propiedades. Hasta la fecha se han identificado diez isoenzimas distintas en células de mamífero (Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1995; Mellor y Parker, 1998; Newton y Johnson, 1998; Newton, 2001), las cuales se han clasificado en tres grandes subfamilias atendiendo a su estructura primaria y al requerimiento de distintos cofactores para la regulación de su actividad enzimática (Figura I.5):

- **PKCs clásicas o convencionales (cPKC)**: está formada por las isoenzimas α , β I, β II y γ (Inoue y col., 1977; Coussens y col., 1986). El gen de la PKC β puede producir, mediante un procesamiento alternativo del ARN antes de la obtención del ARNm, dos productos génicos con diferencias únicamente en su extremo carboxilo terminal (Ono y col., 1987b).
- **PKCs nuevas (nPKC)**: incluye las isoenzimas ϵ , δ (Ono y col., 1987a), η (Osada y col., 1990) y θ (Osada y col., 1992).
- **PKCs atípicas (aPKC)**: contiene las isoenzimas ζ (Ono y col., 1987a), ι (Selbie y col., 1993), cuyo homólogo en ratón se denomina λ , y μ (Valverde y col., 1994; Johannes y col., 1994).

Algunos autores consideran a las isoenzimas μ y ν de la PKC como una subfamilia distinta del resto, aunque otros, sin embargo, proponen que se incluyan como una familia distinta denominada proteína quinasa D (PKD) (Johannes y col., 1994; Rozengurt y col., 1995).

Además, recientemente se ha caracterizado un grupo de quinasas que poseen una estructura catalítica que comparte similitudes de secuencia importantes con el dominio catalítico de la PKC. Estas quinasas forman el grupo de proteínas quinasas N (PKN) o quinasas relacionadas con PKC (PRK) (Dekker y col., 1995).

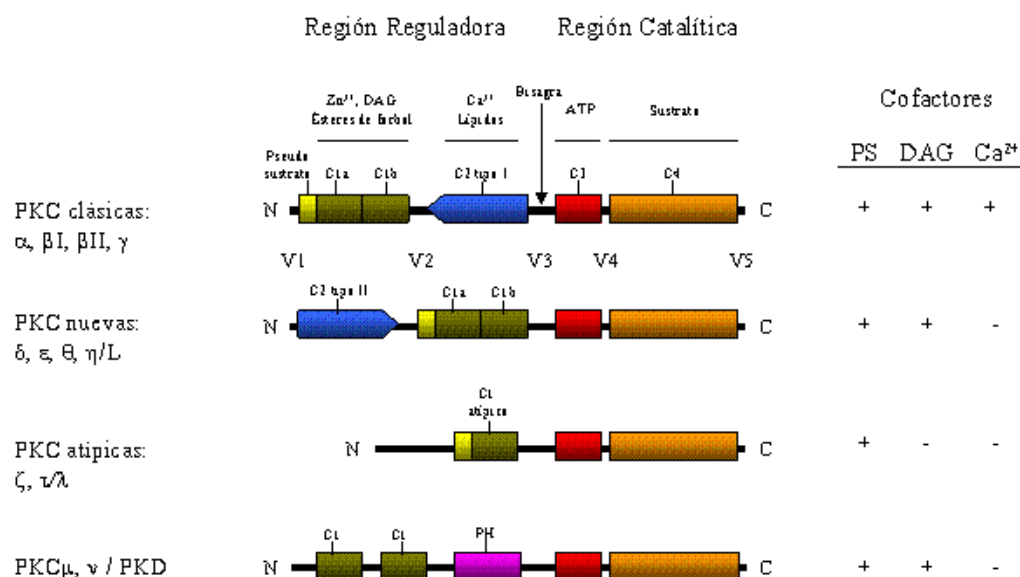


Figura 1.5. Representación esquemática de la estructura primaria de las isoenzimas de la PKC. Se muestran los distintos dominios que la forman, así como los requerimientos de cofactores para su regulación. El extremo amino terminal contiene la región reguladora con el dominio pseudosustrato, el dominio C1 de unión a DAG y ésteres de forbol, el dominio C2 de unión a fosfolípidos aniónicos y calcio y el dominio PH de unión a fosfinosítidos. El extremo carboxilo terminal contiene la región catalítica de la enzima, con los dominios C3 de unión a ATP y C4 de unión a sustrato.

El grupo de las *PKCs clásicas* requiere fosfolípidos cargados negativamente, DAG o ésteres de forbol, y calcio para su activación óptima. El grupo de las *PKCs nuevas* depende de fosfolípidos cargados negativamente y de DAG o ésteres de forbol para su activación óptima y son independientes de calcio. Por último, el grupo de las *PKCs atípicas* sólo requiere la presencia de fosfolípidos cargados negativamente para su activación. No obstante, la PKC μ , a diferencia de las

isoenzimas atípicas, requiere fosfolípidos cargados negativamente y de DAG o ésteres de forbol para su activación óptima, aunque es independiente de calcio (Figura I.5) (Kitagawa y col., 1991; Nishizuka, 1995; Mellor y Parker, 1998; Newton y Johnson, 1998; Newton, 2001).

Desde el punto de vista estructural, todas las isoenzimas de la PKC consisten en una sola cadena polipeptídica donde se pueden identificar dos regiones bien definidas: la *región reguladora* en el extremo amino-terminal y la *región catalítica* en el extremo carboxilo-terminal (Coussens y col., 1986), las cuales quedan separadas por la región variable V3 o bisagra (Newton, 1993). Las principales diferencias estructurales entre las distintas isoenzimas de la PKC se localizan fundamentalmente en la región reguladora.

Las *PKCs clásicas* presentan cuatro dominios conservados (C1, C2, C3 y C4) y cinco regiones variables (V1, V2, V3, V4 y V5) (Coussens y col., 1986) (Figura I.5). La región reguladora incluye la secuencia pseudosustrato y los dominios C1 y C2, mientras que la región catalítica presenta los dominios conservados C3 y C4. La secuencia pseudosustrato es capaz de bloquear el dominio catalítico C4, inhibiendo así la actividad enzimática (House y Kemp, 1987). El dominio C1 posee una región rica en aminoácidos Cys y aparece duplicado (C1a y C1b), siendo el responsable de la unión al DAG y a los ésteres de forbol (Bell y Burns, 1991). El dominio C2 de las PKC clásicas es de tipo I y contiene los sitios de enlace para fosfolípidos ácidos y para Ca^{2+} (Medkova y Cho, 1998a; Corbalán-García y col., 1998; Verdaguer y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2000). Los dominios C3 y C4 de la región catalítica poseen, respectivamente, los sitios de enlace para ATP y para el sustrato de la actividad enzimática (Hanks y col., 1988; Kemp y Pearson, 1990).

Las *PKCs nuevas* son estructuralmente similares a las anteriores. Contienen también dos dominios C1 y un dominio C2 (Figura I.5), pero a diferencia de las isoenzimas clásicas, el dominio C2 de las nuevas es de tipo II y se sitúa en el extremo amino terminal, por delante de los dominios C1 (Nalesfki y Falke, 1996). Además, este dominio C2 no contiene los sitios de enlace para Ca^{2+} (Newton, 1995b; García-García y col., 2001; Ochoa y col., 2001).

Finalmente, las *PKC atípicas* sólo poseen un dominio C1 (Figura I.5), denominado atípico (Ono y col., 1987a) y no contienen dominio C2 (Ohno y col., 1988; Ono y col., 1988b). La isoenzima μ no guarda muchas similitudes con las isoenzimas atípicas. Contiene dos dominios C1 y un dominio de homología con pleckstrina (dominio PH) (Johannes y col., 1994) que parece tener un papel inhibidor de la actividad enzimática (Iglesias y Rozengurt, 1998).

La mitad amino-terminal de las *proteínas quinasas N* (PKN) y las *proteínas quinasas relacionadas con la PKC* (PKR) (Dekker y col., 1995) contiene un dominio C2 similar al de las PKC nuevas y una cremallera de leucina en lugar del dominio C1 (Mukai y Ono, 1994; Palmer y col., 1995a). Estas quinasas no son sensibles a Ca^{2+} ni a ésteres de forbol (Mukai y col., 1994; Palmer y Parker, 1995), aunque debido a la presencia del dominio C2, se activan por los fosfolípidos aniónicos y fosfatidilinositoles, como el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato y el fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (Palmer y col., 1995a). También, se ha comprobado que la proteína GTPasa Rho se une y activa a la PKN en presencia de GTP (Amano y col., 1996; Watanabe y col., 1996), lo cual destaca la importancia de las interacciones proteína-proteína en la regulación de esta enzima.

3.2. Dominios conservados de las PKCs.

3.2.1. Dominio pseudosustrato.

Todas las isoenzimas de la PKC, a excepción de la PKC μ (Gschwendt y col., 1997), contienen un dominio pseudosustrato autoinhibitorio en la región reguladora del extremo amino terminal. Este dominio mantiene a la PKC en una conformación inactiva por bloqueo estérico de su sitio activo, mediante la interacción con la región catalítica (House y Kemp, 1987; Makowske y Rosen, 1989; Soderling y col., 1990; Orr y col., 1992). De esta forma, para la activación de la PKC es necesario que se produzca el desplazamiento del dominio pseudosustrato del sitio activo (Figura I.6) (Orr y col., 1992). Normalmente, la activación de la PKC se produce mediante la unión de determinados efectores lipídicos a los dominios C1 y C2, aunque también se ha descrito que ciertas interacciones entre péptidos o proteínas ricas en Arg y el dominio catalítico pueden provocar la liberación del dominio pseudosustrato del sitio

activo y la consecuente activación de la enzima (Takai y col., 1979; Leventhal y Bertics, 1993).

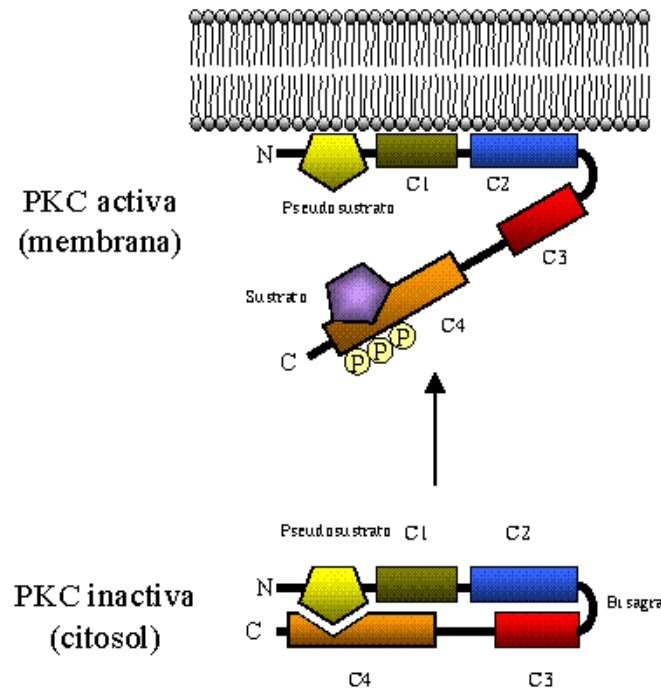


Figura I.6. Representación esquemática de la acción del dominio pseudosustrato. Se muestran las conformaciones inactiva y activa de la PKC. En la conformación inactiva, el dominio pseudosustrato se encuentra unido a la región catalítica de la PKC. Al producirse la unión de diversos efectores lipícos a los dominios próximos, el dominio pseudosustrato se libera de la región catalítica y la PKC adopta la conformación activa

Este dominio pseudosustrato se localiza junto al extremo amino terminal del dominio C1 de las PKCs clásicas en la región reguladora de la proteína y consiste en una pequeña secuencia consenso con aminoácidos de carácter básico, situada entre los residuos 19 y 36 en PKC α (House y Kemp, 1987). Esta secuencia consenso también existe en los sustratos de la PKC, con la única diferencia de que el residuo fosforilable de los sustratos (Ser o Thr) está sustituido por Ala en el caso del pseudosustrato (Figura I.7) (House y Kemp, 1987; Nishikawa y col., 1997). La mutación de esta Ala a Ser en el pseudosustrato confiere actividad independiente de efector en la proteína mutante (Makowske y Rosen, 1989; Pears y col., 1990). Por otro lado, las mutaciones de los residuos Ser o Thr a Ala en las secuencias de reconocimiento de los diferentes sustratos de la PKC producen el mismo efecto inhibitor que el dominio pseudosustrato (Pears y col., 1990).

Algunos autores proponen que sólo cuando desaparece la conformación inactiva de la PKC producida por la interacción entre el dominio pseudosustrato y la región catalítica, es posible que el dominio C1 de la PKC se pueda unir a DAG (Oancea y Meyer, 1998). En cambio, otros autores sostienen que primero deben unirse el DAG y la fosfatidilserina a los dominios C1 y C2 de la proteína respectivamente, para que entonces se produzca un cambio conformacional que permita la retirada del dominio pseudosustrato del sitio activo de la enzima (Newton, 1995b; Johnson y col., 2000). Además, se ha demostrado que una vez retirado el pseudosustrato del sitio catalítico, los residuos básicos del mismo podrían interactuar con los lípidos aniónicos de la membrana para estabilizar así el enlace de la proteína a la membrana (Orr y Newton, 1992).

Isoenzima		Posición												
		7	6	5	4	3	2	1	0	+1	+2	+3	+4	+5
PKC α	Sustrato óptimo	R	R	R	R	R	K	G	S	F	R	R	K	A
	Pseudosustrato	N	R	F	A	R	K	G	A	L	R	Q	K	N
PKC δ	Sustrato óptimo	A	R	R	K	R	K	G	S	F	F	Y	G	G
	Pseudosustrato	P	T	M	N	R	R	G	A	I	K	Q	A	K
PKC ζ	Sustrato óptimo	R	R	F	K	R	Q	G	S	F	F	Y	F	F
	Pseudosustrato	K	S	I	Y	R	R	G	A	R	R	W	R	K

Figura I.7. Alineación de las secuencias del dominio pseudosustrato y los sustratos óptimos de la PKC. Se muestran las secuencias de los dominios pseudosustratos de las isoenzimas clásicas (PKC α), nuevas (PKC δ) y atípicas (PKC ζ), junto con las secuencias de los sustratos óptimos para las mismas isoenzimas. El residuo fosfoaceptor se resalta en negrita en la posición 0. Tomado de Nishikawa y col. (1997).

3.2.2. Dominio C1.

Las isoenzimas clásicas y nuevas de la PKC contienen un dominio C1 que contiene aproximadamente unos 50 residuos y se define por la presencia de dos motivos de dedos de zinc, llamados C1a y C1b (Parker y col., 1986). Cada uno de estos dedos de zinc se caracteriza por presentar un patrón conservado de residuos de Cys e His (HX₁₂CX₂CX_{13/14}CX₂CX₄HX₂CX₂CX₇C), el cual es el responsable de la coordinación de dos iones Zn²⁺ (Hubbard y col., 1991; Quest y col., 1992). Mediante estudios de RMN y de difracción de rayos X se ha podido determinar la estructura tridimensional de estos motivos C1 (Hommel y col., 1994; Zhang y col., 1995) y se

ha observado que presentan una estructura globular formada por dos hojas β antiparalelas, con tres y dos cadenas respectivamente, y una pequeña hélice α en el extremo carboxilo terminal (Figura I.8). Los átomos de Zn^{2+} se localizan al final de cada una de las hojas β , en los extremos opuestos del dominio, donde están coordinados por los residuos conservados de His y ayudan a estabilizar la estructura globular del dominio. La estructura del dominio C1 es similar a la de los dedos de zinc de ciertas proteínas responsables del enlace a ADN para la regulación transcripcional (Berg, 1990), a pesar de que parece ser que la PKC no se une a ADN de forma habitual (Testori y col., 1988)

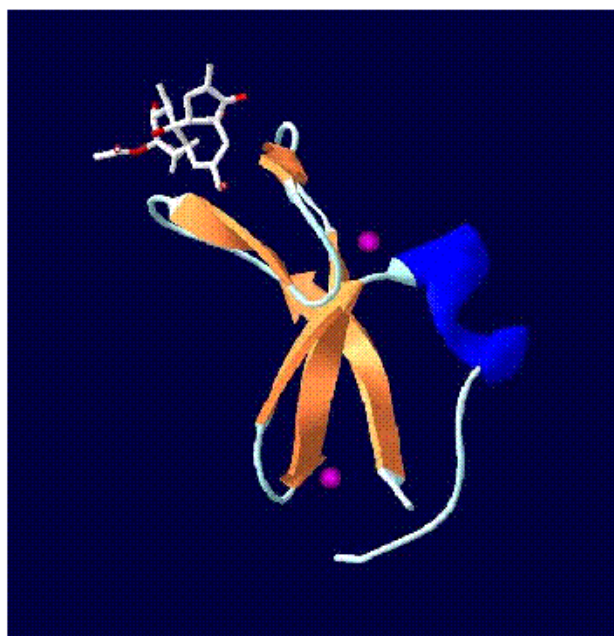


Figura I.8. Estructura del dominio C1b de la PKC δ . Se muestra la estructura tridimensional del dominio C1b de la PKC δ unido a PMA (Zhang y col., 1995). La molécula de PMA se encontraría inmersa en la membrana. Los átomos de zinc se representan en rosa en ambos lados de las hojas β .

Inicialmente, mediante diferentes estudios de mutagénesis y delección de aminoácidos, se propuso que el dominio C1 era el sitio de unión de ésteres de forbol (Kaibuchi y col., 1989; Ono y col., 1989), lo cual se confirmó posteriormente con la resolución de la estructura tridimensional del motivo C1b de la PKC δ complejoado con PMA (Zhang y col., 1995). Además, diversos estudios de unión a ligandos mostraron que el DAG compite con los ésteres de forbol por el enlace a la PKC

(Sharkey y Blumberg, 1985). El 12-miristato-13-acetato (PMA) se une a una cavidad formada por el acoplamiento de las dos hojas β que componen el dominio (Newton, 1997). La unión de este éster de forbol no supone grandes cambios conformacionales en el dominio C1b e incluso parece ser que el ligando bloquea una zona hidrofílica en la parte superior del dominio, de modo que se forma así una región hidrofóbica en la superficie del mismo que permite su anclaje a la membrana (Zhang y col., 1995).

A pesar de que las isoenzimas clásicas y nuevas de la PKC poseen dos motivos C1, numerosos estudios han demostrado que la estequiometría de la unión de éster de forbol a la PKC es 1:1 (Kikkawa y col., 1983; König y col., 1985; Hamun y Bell, 1986; Mosior y Newton, 1996), lo cual sugiere que la función proteica está regulada por uno solo de los dominios C1.

Estudios recientes con dominios C1a y C1b sintetizados *in vitro* de todas las isoenzimas de la PKC, han puesto de manifiesto que los dominios C1b muestran afinidades mayores por el éster de forbol 12,13-dibutirato (PDBu) que los dominios C1a (Irie y col., 1998). Esta idea está de acuerdo con estudios previos de mutagénesis que demostraron que los dos dominios C1 de la PKC δ (C1a y C1b) no son equivalentes y parece ser que el dominio C1b es el principal responsable de la unión de DAG y ésteres de forbol. En concreto, la mutación de un residuo conservado de Pro en el dominio C1b de la PKC δ provoca la pérdida de afinidad por ésteres de forbol, mientras que la mutación del residuo equivalente en el dominio C1a tiene un efecto muy pequeño (Szallasi y col., 1996). En cambio, estas hipótesis no son aplicables al resto de dominios C1 de la PKC y así, los dominios C1 de la PKC γ tienen afinidades similares (Burns y Bell, 1991; Irie y col., 1998), mientras que en el caso de la PKC α , el dominio C1a es el esencial para la unión de ligando y activación de la enzima y el dominio C1b no está implicado en estos procesos (Medkova y Cho, 1999). Otros experimentos llevados a cabo con ésteres de forbol han demostrado que los dominios C1a y C1b desempeñan un papel equivalente en la traslocación a la membrana inducida por el PMA (Bogi y col., 1998). Estos resultados aparentemente contradictorios con los expuestos anteriormente, apoyan la hipótesis de que el DAG y los ésteres de forbol tienen afinidades distintas por cada dominio C1 (Medkova y Cho, 1999). Esta selectividad del dominio C1a de la PKC α parece deberse a su

capacidad para penetrar en la membrana e interactuar con el DAG que está parcialmente inmerso en ella (Medkova y Cho, 1999).

El dominio C1 aislado posee un extraordinario poder de penetración en comparación con la proteína entera, lo cual sugiere que en la proteína completa el resto de dominios limitan el poder de penetración de los dominios C1 (Medkova y Cho, 1999). Hay algunas evidencias que proponen que existe cierta relación del dominio C1 con otras zonas de la PKC. Así, estudios recientes de mutagénesis dirigida han demostrado que la mutación del residuo de Asp55 a Ala produjo la reducción en la especificidad por la fosfatidilserina en ensayos de unión y actividad, pero una mayor afinidad por vesículas, mayor actividad y mayor poder de penetración que la proteína tipo silvestre en condiciones de no activación (con fosfatidilglicerol y en ausencia de Ca^{2+}). Esto sugiere que el Asp55 está implicado en la unión del dominio C1a con otra zona de la PKC α (Bittova y col., 2001).

Las isoenzimas atípicas de la PKC contienen un dominio C1 diferente, con un solo motivo de “dedos de zinc”, el cual no es capaz de enlazar ésteres de forbol o DAG (Akimoto y col., 1994). Se ha observado que este dominio C1 atípico carece de los residuos hidrofílicos necesarios para enlazar esos ligandos específicos y formar la superficie hidrofóbica en el sitio de unión de ligando (Mott y col., 1996) y muestra más homología con el dominio C1a que con el C1b de las isoenzimas clásicas y nuevas de la PKC (Szallasi y col., 1996). La función de los dominios C1 en las isoenzimas PKC que no unen DAG o ésteres de forbol se desconoce hasta ahora.

Los dominios C1 también están presentes en otras proteínas de mamífero además de en la PKC. En algunas de ellas, como las quimerinas o las proteínas Ras liberadoras de guanilo (ras-GRP), los dominios C1 están presentes en una sola copia y unen ésteres de forbol y DAG (Caloca y col., 1994; Ebinu y col., 1998; Kazaniet, 2000), quedando dentro del grupo de los dominios C1 típicos. En otros casos, como ocurre con la proteína Raf-1 o en la quinasa supresora de Ras (KSR), el dominio C1 no une ni DAG ni PMA, por lo que se conoce también como dominio C1 atípico (Luo y col., 1997; Newton, 1998; Zhuo y col., 2002). Un caso curioso es la proteína diacilglicerol quinasa (DAG quinasa), la cual contiene un dominio C1 que inicialmente parecía ser independiente de DAG y PMA (Sakane y col., 1996;

Newton, 1998), aunque recientemente se ha demostrado que interacciona con ésteres de forbol (Sindo y col., 2001).

Por otro lado, los ésteres de forbol se pueden unir a otras proteínas además de la PKC para activarlas. De esta forma, por ejemplo, el PMA estimula la actividad de las proteínas GAP (proteínas que activan a GTPasa) hacia la GTPasa Rac (Ahmed y col., 1993).

3.2.3. Dominio C2.

Numerosas proteínas que están implicadas en las vías de señalización celular o en el tráfico de vesículas contienen un dominio C2. En un principio, el dominio C2 se identificó como el segundo de los cuatro dominios conservados presentes en las isoenzimas clásicas de la PKC (Coussens y col., 1986; Knopf y col., 1986; Ono y col., 1987a; Ono y col., 1987b; Parker y col., 1986). Inicialmente se propuso que este dominio C2 era el responsable de la unión de Ca^{2+} , ya que se sabía que las isoenzimas clásicas de la PKC eran dependientes de Ca^{2+} y se creía que las isoenzimas nuevas de la PKC eran independientes de Ca^{2+} y carecían de este dominio.

Posteriormente, se identificó la presencia de dominios C2 homólogos en multitud de proteínas relacionadas o no con las PKCs. Así, se encontraron dos dominios C2 en la porción citosólica de la sinaptotagmina, una proteína integral de membrana sensible a Ca^{2+} que se localiza en vesículas sinápticas (Perin y col., 1990). Ya que tanto la PKC como la sinaptotagmina se podían enlazar a vesículas de fosfatidilserina en presencia de Ca^{2+} (Bazzi y Nelsestuen, 1987; Bazzi y Nelsestuen, 1990; Brose y col., 1992), se pensó que el dominio C2 podría estar implicado en la unión a fosfolípidos ácidos dependiente de Ca^{2+} . También se identificó un dominio C2 en el extremo amino terminal de la fosfolipasa A_2 citosólica dependiente de Ca^{2+} (PLA_2c) (Clark y col., 1991), así como en la proteína Ras-GAP que activa a la Ras-GTPasa (Trahey y col., 1988) y en todas las isoenzimas de fosfolipasas C específicas de fosfoinosítidos (PLC) (Rhee y col., 1989; Kriz y col., 1990), mediante la comparación de secuencia con la PLA_2c . Igualmente también se identificó un dominio C2 en una proteína llamada Rabfilina-3A, la cual se une a la GTPasa Rab3A y está implicada en el tráfico de vesículas (Shirataki y col., 1993). Más

recientemente, se han encontrado dominios C2 en otras proteínas, como por ejemplo, en la proteína DOC2 presente en las vesículas sinápticas (Orita y col., 1995); en la proteína perforina presente en los gránulos de secreción de células T citotóxicas (Ponting y Parker, 1996); en la proteína Munc-13, al parecer implicada en la transmisión sináptica (Brose y col., 1995); en la proteína GAP1, que activa a la Ras GTPasa (Maekawa y col., 1994); y en una proteína R-RasGAP/GAP1 activadora de R-Ras GTPasa (Cullen y col., 1995; Yamamoto y col., 1995). También se han identificado dominios C2 en la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), la cual está implicada en la fosforilación de varios fosfoinosítidos (Stephens y col., 1993), en la PTEN, una fosfatasa de residuos de tirosina (Lee y col., 1999), en la proteína Nedd-4 (Plant y col., 1997) y en la proteína RIM (Wang y col., 1997), entre otras.

Aunque inicialmente no se identificaron dominios C2 en las isoenzimas nuevas de la PKC, las cuales son independientes de Ca^{2+} , también están presentes en el extremo amino terminal de las mismas, demostrando así que no todas las proteínas que contenían el dominio C2 estaban reguladas por Ca^{2+} , y en las proteínas homólogas de la PKC en levaduras. Posteriormente también se han identificado dominios C2 en las quinasas relacionadas con PKC o PRK (Sossin y Schwartz, 1994; Newton, 1995; Ponting y Parker, 1996).

Por lo tanto, la función más conocida del dominio C2 es la de interactuar con fosfolípidos. Por ejemplo, en el caso de la PKC, el dominio C2 se une a fosfolípidos para permitir el anclaje de la proteína a la membrana y, por tanto, su activación. Dicha unión puede estar mediada por Ca^{2+} , como es el caso de las PKC clásicas (Newton, 1998), o puede ser independiente de Ca^{2+} , como en las PKC nuevas (Nalefski y Falke, 1996). Algunos dominios C2 se unen a fosfatidilinosítoles, generalmente de forma independiente de Ca^{2+} (Hurley y Misra, 2000; Corbalán-García y col., 2003).

Otra función de los dominios C2 es la de intervenir en interacciones proteína-proteína de forma dependiente o independiente de Ca^{2+} . Así, por ejemplo, el dominio C2A de la sinaptotagmina I se une a la syntaxina 1 de una forma dependiente de Ca^{2+} (Li y col., 1995; Ubach y col., 1998), mientras que el dominio C2B de la misma proteína se une a las proteínas AP-2 y β -SNAP y a canales de Ca^{2+} de una manera

independiente de Ca^{2+} (Zhang y col., 1994; Fukuda y col., 1994; Fukuda y col., 1995; Schiavo y col., 1995; Sheng y col., 1997). Por otro lado, recientemente se ha identificado la interacción entre que el dominio C2 de la PKC δ con la proteína GAP-43, una proteína implicada en la diferenciación neuronal (Dekker y Parker, 1997). Otro ejemplo es el de los RACK (receptores para PKC activadas), los cuales no son sustratos de la PKC pero interaccionan con su dominio C2 para dirigirla a diferentes compartimentos celulares (Mochly-Rosen, 1995; Csukai y col., 1997; Katan y Allen, 1999).

En resumen, la mayoría de proteínas con dominios C2 están implicadas en dos grandes procesos: la transducción de señales y el tráfico a través de membrana. Ejemplos del primer caso son las proteínas implicadas en la generación de segundos mensajeros (PLA₂c, PLC y PI3K), en la fosforilación (PKC, PRK) y desfosforilación (PTEN) de proteínas o en la activación de GTPasas (Ras-GAP y BUD2), mientras que como ejemplos del segundo caso encontramos a la sinaptotagmina, la Rabfilina-3A, la DOC2, la perforina o la UNC-13 (Nalefski y Falke, 1996).

3.2.3.1. Estructura de los dominios C2.

La primera estructura tridimensional de un dominio C2 se obtuvo por difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear del dominio C2 de la sinaptotagmina I (C2A) (Sutton y col., 1995; Shao y col., 1996). Posteriormente se obtuvo la estructura tridimensional de la PLC- δ 1 completa, la cual contiene un dominio C2 en el extremo carboxilo terminal (Essen y col., 1996). En ambos casos, los dominios C2 contienen aproximadamente unos 130 aminoácidos y presentan una estructura muy similar, la cual consiste en ocho cadenas β antiparalelas agrupadas en dos hojas de cuatro cadenas cada una que forman un sándwich β compacto. Sin embargo, estos dominios C2 pueden presentar dos plegamientos topológicos alternativos, que se diferencian únicamente en las conexiones de sus cadenas (Figura I.9). De esta forma, el dominio C2A de la sinaptotagmina I presenta una topología tipo I, mientras que el dominio C2 de la PLC- δ 1 una topología tipo II. Ambas topologías son fácilmente interconvertibles, ya que la topología tipo I se convierte en topología tipo II cuando sus extremos amino y carboxilo terminales se fusionan y se generan nuevos extremos terminales cortando el bucle entre las cadenas β 1 y β 2

(Nalefski y Falke, 1996). La principal diferencia entre las dos topologías es que la primera cadena de la topología I ocupa la misma posición estructural que la octava cadena de la topología II, lo que desplaza el orden de las cadenas homólogas en la estructura primaria (Figura I.9). Aunque no está claro por qué los dominios C2 se presentan en dos topologías, una hipótesis propuesta podría ser que la topología influye en la orientación relativa del dominio C2 con respecto a sus dominios cercanos (Nalefski y Falke, 1996; Rizo y Südhof, 1998).

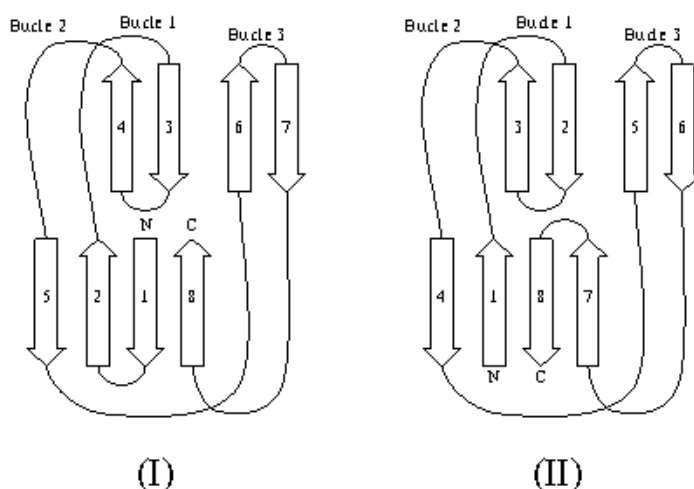


Figura I.9. Representación esquemática de las dos topologías del dominio C2. Se muestran las topologías tipo I (sinaptotagmina I) y tipo II (PLC- δ 1) de los dominios C2. Como se puede apreciar ambas topologías son fácilmente interconvertibles como se cita en el texto.

Posteriormente se obtuvieron las estructuras tridimensionales del dominio C2 de la PLA₂c (Perisic y col., 1998; Dessen y col., 2000), del dominio C2B de la rabfilina (Ubach y col., 1999), del dominio C2A y C2B de la sinaptotagmina III (Sutton y col., 1999), del dominio C2B de la sinaptotagmina I (Fernández y col., 2001) y de los dominios C2 de la PKC β (Sutton y Sprang, 1998), de la PKC δ (Pappa y col., 1998), de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y de la PKC ϵ (Ochoa y col., 2001). Asimismo, también se definieron las estructuras tridimensionales de proteínas con dominios C2 como la m-calpaína (Hosfield y col., 1999), la proteína PTEN (Lee y col., 1999) y la proteína fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Pacold y col., 2000). Las estructuras de los dominios C2 de todas estas proteínas son también similares a las de los dominios C2 de la sinaptotagmina I y de la PLC- δ 1 anteriormente comentadas.

En el caso de la PKC, los dominios C2 de la PKC α y de la PKC β presentan topología tipo I, los dominios C2 de la PKC δ y de la PKC ϵ poseen topología tipo II. Aunque no se conocen todas las estructuras de los dominios C2 de la PKC, el análisis de la secuencia sugiere que los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC adoptan la topología tipo I, mientras que los de las isoenzimas nuevas de la PKC presentan topología tipo II (Nalefski y Falke, 1996).

Mediante la comparación de las secuencias de los dominios C2 de distintas proteínas se ha observado que la mayoría de las posiciones conservadas se localizan preferentemente en las ocho cadenas β , mientras que las secuencias que forman los bucles prácticamente no contienen residuos conservados (Nalefski y Falke, 1996). Además, se ha observado que los residuos de Pro y Gly están concentrados en dichos bucles, facilitando la formación de giros en estos tramos. En algunos dominios, algunas secuencias entre las cadenas β son más largas, lo cual indica que podrían proporcionar funciones específicas a la proteína. Todo esto sugiere que la conformación de sándwich β de los dominios C2 tiene únicamente una función estructural (Nalefski y Falke, 1996), mientras que los distintos bucles están implicados en la unión de Ca²⁺ y fosfolípido y podrían determinar de esta forma la especificidad funcional del dominio C2 (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002).

3.2.3.2. Sitio de unión de Ca²⁺ en los dominios C2.

En el dominio C2A de la sinaptotagmina I se identificó la presencia de un ión Ca²⁺ al incubar los cristales en una disolución con CaCl₂, localizándose el sitio de unión en una depresión cóncava situada en un extremo del sándwich β y formada por los bucles β 2- β 3 y β 6- β 7 (Sutton y col., 1995). Diversos estudios bioquímicos y estructurales posteriores mediante RMN sugerían que al menos se unen dos iones metálicos a los dominios C2, en lugar del único ion Ca²⁺ observado en esa estructura cristalina. Por ejemplo, estudios de RMN con el dominio C2A de sinaptotagmina I y con el dominio C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC mostraron que al menos se unían dos iones Ca²⁺ con distinta afinidad (Shao y col., 1996). Por otro lado, también se pueden unir dos iones La³⁺, análogo de Ca²⁺, a la PLC- δ 1, aproximadamente en los sitios homólogos observados en la sinaptotagmina I (Essen y col., 1996; Grobler y col., 1996).

A partir de estos estudios de RMN y de cristalización del dominio C2A de la sinaptotagmina I se propuso el esquema de coordinación de Ca^{2+} (Figura I.10), en el que las cadenas laterales de diversos residuos de Asp participarían en la coordinación de los dos iones Ca^{2+} unidos a dicho dominio (Shao y col., 1996), el cual es válido para otros dominios C2 con ambas topologías. Teniendo en cuenta la estructura tridimensional del dominio C2A de la sinaptotagmina I (Sutton y col., 1995), las posiciones de coordinación de Ca^{2+} quedan situadas en los bucles $\beta 2$ - $\beta 3$ y $\beta 6$ - $\beta 7$ en la topología I o bien los bucles $\beta 1$ - $\beta 2$ y $\beta 5$ - $\beta 6$ en la topología II (Nalefski y Parker, 1996). El primer bucle se conoce como región de unión a Ca^{2+} 1 (CBR1, en inglés), mientras que el segundo es la región de unión a Ca^{2+} 3 (CBR3). Estos bucles se aproximan entre sí para acercar espacialmente una serie de residuos de Asp que son los que específicamente interaccionan con el Ca^{2+} (Sutton y col., 1995) (Figura I.10). En este modelo, los dos iones Ca^{2+} están relacionados entre sí por un eje de simetría pseudo-binario, y están coordinados a los oxígenos de los grupos carboxilo de la cadena lateral de cinco residuos de Asp de las posiciones 172, 178, 230, 232 y 238. Mientras que los residuos Asp172, Asp230 y Asp232 se coordinan con los dos iones Ca^{2+} a la vez, el Asp178 y el Asp238 sólo se coordinan con un ión Ca^{2+} cada uno. Oxígenos del esqueleto carbonilo o de la disolución intervienen también en la coordinación final de cada ion.

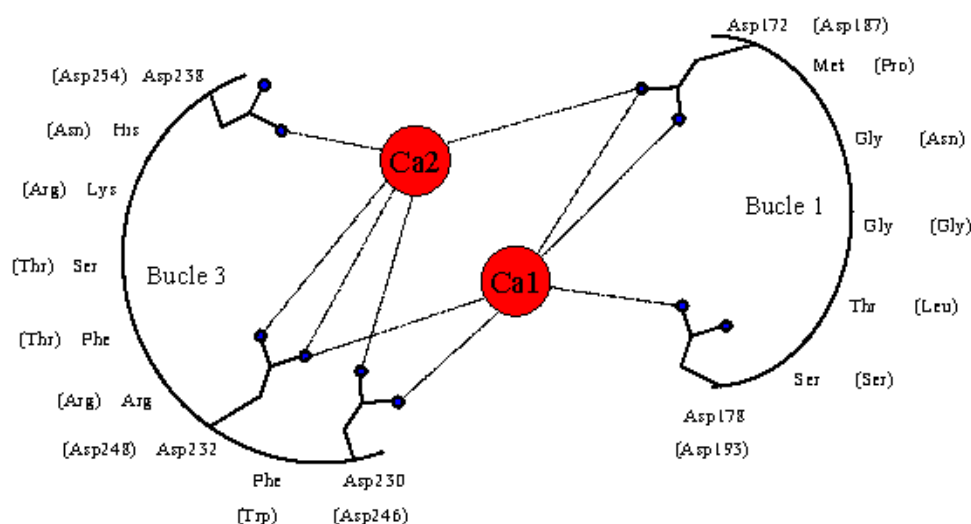


Figura I.10. Modelo de la estructura de los bucles de enlace a Ca^{2+} de la sinaptotagmina I. En él se muestran los residuos de Asp implicados en la coordinación con dos iones de Ca^{2+} . Asimismo, se muestran entre paréntesis los residuos correspondientes al dominio C2 de la PKC α . (Verdaguer y col., 1999). Cada uno de los bucles que intervienen en la coordinación de Ca^{2+} se denominan regiones de enlace a Ca^{2+} (CBR). Este modelo está basado en el descrito por Shao y col. (1996).

Posteriormente, con la resolución de la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC β (Sutton y Sprang, 1998) se observaron tres iones Ca^{2+} unidos y que los sitios de unión de Ca^{2+} parecían estar hexacoordinados o heptacoordinados. En este caso, dos de los iones Ca^{2+} están coordinados de forma similar a la descrita anteriormente en el modelo para la sinaptotagmina I, e implican a los oxígenos de las cadenas laterales de cinco Asp (187, 193, 246, 248, 254) y de Trp247, Met186 y Glu281. El sitio de unión del tercer ion Ca^{2+} incluye coordinaciones con tres Asp (248, 252 y 254), además de Ser251 y Glu281 (Figura I.11). Para el caso de la sinaptotagmina I, algunas evidencias sugieren que el tercer sitio sólo está ocupado a altas concentraciones de Ca^{2+} (Shao y col., 1996). De esta forma, la presencia del tercer ion Ca^{2+} depende en gran medida de la intervención de fosfolípidos u otros ligandos, de manera que en ausencia de un ligando aniónico externo el enlace del tercer Ca^{2+} es muy débil (Sutton y Sprang, 1998; Ubach y col., 1998).

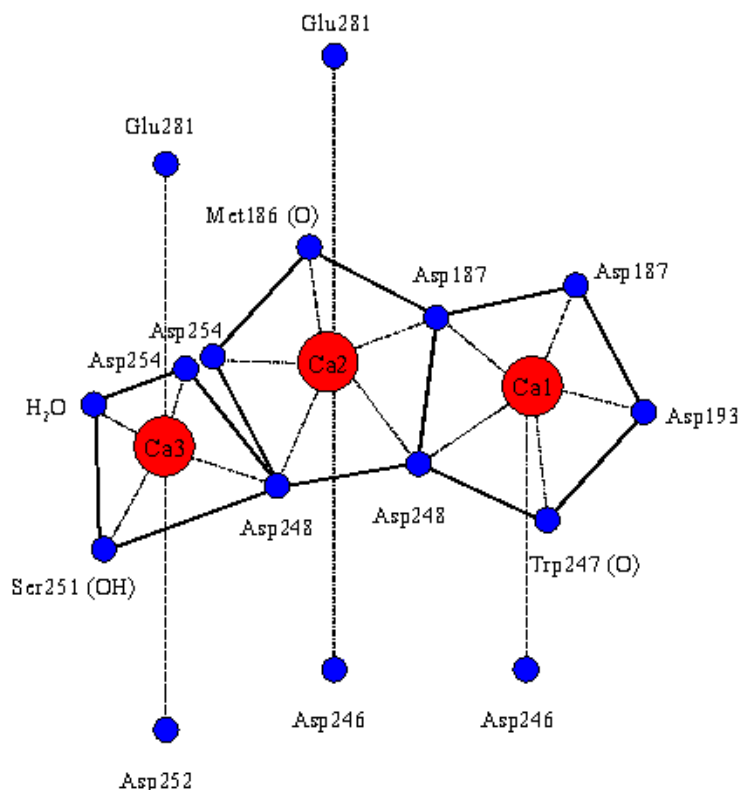


Figura I.11. Modelo de la estructura de los bucles de enlace a Ca^{2+} de la PKC β I. En él se muestran los residuos de Asp implicados en la coordinación con tres iones de Ca^{2+} . Este modelo está basado en el descrito por Sutton y Sprang (1998).

Más recientemente se ha resuelto la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α unido a dos iones Ca^{2+} y a una molécula de un pequeño fosfolípido soluble, llamado 1,2-dicaproil-*sn*-glicero-fosfoserina (DCPS) (Verdaguer y col., 1999), así como la estructura tridimensional del mismo dominio unido a tres iones Ca^{2+} y a una molécula de 1,2-diacetil-*sn*-glicero-fosfoserina (DCPA) (Figura I.12) (Ochoa y col., 2002).

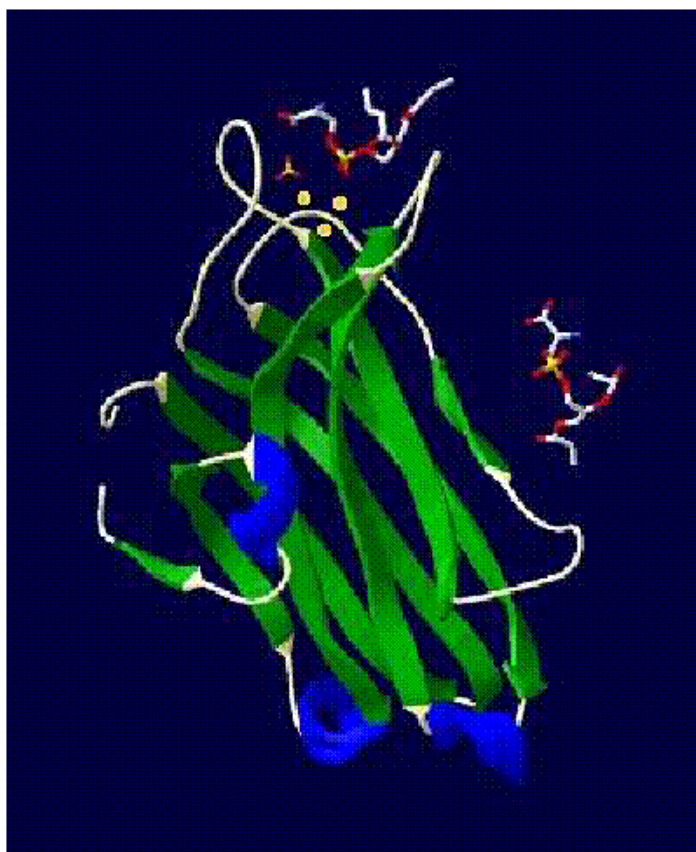


Figura I.12. Estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α . Se muestra el dominio C2 de la PKC α en presencia de tres iones Ca^{2+} y un fosfolípido de cadena corta (DCPA) (Ochoa y col., 2002). Los iones Ca^{2+} se muestran en amarillo.

En el primer caso (Verdaguer y col., 1999), los sitios de unión de los dos iones Ca^{2+} corresponden a las mismas posiciones indicadas en el modelo de sinaptotagmina I (Figura I.10), y a las de dos de los tres iones Ca^{2+} unidos al dominio C2 de la PKC β (Figura I.11), ya que el tercer sitio de unión en el dominio C2 de la PKC α está ocupado por una molécula de agua. De esta forma, las cadenas laterales

de cinco Asp (187, 193, 246, 248, 254) y la cadena principal de los residuos Met186 y Trp248, proporcionan seis de los siete oxígenos que coordina cada uno de los iones Ca^{2+} (Figura I.13A). Uno de los iones completa su coordinación con el oxígeno de una molécula de agua y el otro con uno de los oxígenos del grupo fosforilo de la molécula lipídica DCPS (Figura I.13A).

En el segundo caso (Ochoa y col., 2002) (Figura I.12), los sitios de unión de los tres iones Ca^{2+} corresponden a las mismas posiciones indicadas en el modelo del dominio C2 de la PKC β (Figura I.11). De esta forma, las cadenas laterales de cinco Asp (187, 193, 246, 248, 254) y la cadena principal de los residuos Met186 y Trp247, proporcionan oxígenos para la coordinación de los iones Ca^{2+} (Figura I.13A). Uno de los iones Ca^{2+} (Ca3) completa su coordinación con el oxígeno de una molécula de agua, del residuo Arg 252 y de un grupo fosfato, el cual también coordina a otro de los iones Ca^{2+} (Ca2). Finalmente, el ion Ca^{2+} restante (Ca1) completa su coordinación con uno de los oxígenos del grupo fosforilo de la molécula lipídica DCPA (Figura I.13A)

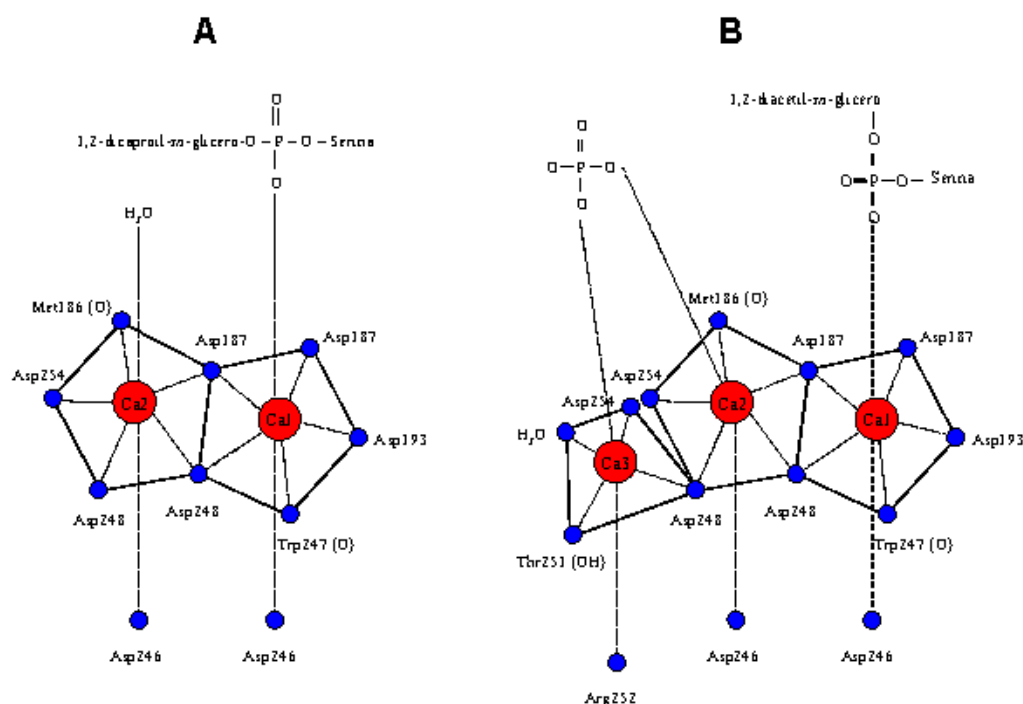


Figura I.13. Modelo de la estructura de los dominios C2 de la PKC α , en presencia de Ca^{2+} y fosfolípido. Se muestran los esquemas con los residuos implicados en la coordinación de dos iones Ca^{2+} y DCPS (A) (Verdaguer y col., 1999) y de tres iones Ca^{2+} y DCPA (B) (Ochoa y col., 2002).

Estas estructuras aclararon la relación del Ca^{2+} en la unión a membrana del dominio C2 de la PKC, apoyando la hipótesis propuesta sobre la actuación del Ca^{2+} como puente entre los grupos funcionales del dominio C2 de la proteína y los del fosfolípido (Swairjo y col., 1995; Corbalán-García y col., 1999), en lugar de como inductor de un cambio conformacional en la proteína capaz de desencadenar la interacción membrana-proteína (Newton, 1995).

Mediante estudios de mutagénesis se ha demostrado que la unión de un ión Ca^{2+} a los residuos Asp de las posiciones 187, 193 y 246 en el dominio C2 de la PKC α es importante para la traslocación inicial de la proteína a la superficie de la membrana, mientras que la unión del otro ión Ca^{2+} a los residuos Asp de las posiciones 187, 246, 248 y 254 induce un cambio conformacional que provoca la penetración en la membrana y la activación de la PKC α (Medkova y Cho, 1998a). Otros estudios han identificado que el residuo Asp187 interviene en la traslocación de la enzima a la membrana inducida por DAG, lo cual establece una nueva relación funcional entre los dominios C1 y C2 de la PKC α (Conesa-Zamora y col., 2000).

La presencia de los cinco residuos de Asp en el sitio de enlace a Ca^{2+} del dominio C2 hace que la superficie del mismo sea muy electronegativa. Por ello, inicialmente se propuso que el enlace del Ca^{2+} a los Asp podía provocar la neutralización de la carga negativa del dominio C2, originando así un cambio electrostático que permitiera el enlace a los lípidos aniónicos de la membrana (Shao y col., 1997), como ocurre en el caso del dominio C2 de la fosfolipasa C δ 1 (Grobler y col., 1996). No obstante, las mutaciones realizadas sobre el dominio C2 de la PKC β II para neutralizar la carga de los Asp no sólo disminuyeron el enlace a membrana sino que también redujeron la afinidad por el Ca^{2+} .

De igual modo, se pudo comprobar que el enlace a Ca^{2+} no producía cambios electrostáticos con la exposición de residuos básicos del dominio C2 hacia la membrana que pudieran mediar en el enlace a lípidos, ya que la mutación de estos residuos a aminoácidos neutros no produjo cambios en la afinidad de la PKC por la membrana (Edwards y Newton, 1997a). La hipótesis del cambio electrostático tras la unión de Ca^{2+} fue desechada finalmente y se propuso que la región de la proteína que interacciona con la membrana debía estar localizada en el mismo sitio de enlace a

Ca^{2+} , lo cual ha sido corroborado con las estructuras tridimensionales obtenidas del dominio C2 de la PKC α en presencia de lípido comentadas anteriormente (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002).

Estudios recientes realizados con el dominio C2 de la PKC α , que muestra selectividad por fosfolípidos aniónicos (Medkova y Cho, 1998b), y con el de la fosfolipasa A₂ (Bittova y col., 1999), que posee selectividad por fosfolípidos neutros como la fosfatidilcolina, sugieren que en el caso del dominio C2 de la PKC α la formación del puente de Ca^{2+} en la interacción lípido-proteína es más importante que el cambio conformacional inducido por Ca^{2+} que, sin embargo, está más implicado en la unión del dominio C2 de la fosfolipasa A₂ a membranas (Cho, 2001).

Por otro lado, se han identificado diferentes aminoácidos de naturaleza catiónica que no se enlazan a Ca^{2+} pero que sí son responsables del enlace de la PKC α a membranas. Así, por ejemplo, los residuos Arg249 y Arg252 están implicados en interacciones electrostáticas de la PKC α con membranas aniónicas, mientras que Trp245 y Trp247 participan en la penetración en las membranas y en las interacciones hidrofóbicas resultantes (Medkova y Cho, 1998a). Otros trabajos han demostrado que Thr 251 y Arg216 también intervienen en la unión de la PKC α a fosfolípidos aniónicos y que el residuo Asn189 interviene en la posterior activación de la enzima (Conesa-Zamora y col., 2001).

Existe una homología significativa entre los distintos dominios C2 en cuanto a las posiciones implicadas en la coordinación de Ca^{2+} observadas en la sinaptotagmina I, como se desprende de la alineación de las secuencias de los distintos dominios C2. No obstante, algunos de estos residuos no están conservados en el caso de los dominios C2 que no unen Ca^{2+} , como es el caso del dominio C2 de la PKC δ o de la PKC ϵ (Nalefski y Falke, 1996). Esta diferencia plantea la posibilidad de que el dominio C2 de las isoenzimas nuevas de la PKC presente ya la estructura necesaria para unir lípidos aniónicos, mientras que el de las clásicas necesite Ca^{2+} para estabilizarse antes de unirse a lípido (Newton y Johnson, 1998). La resolución de la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC ϵ (Ochoa y col., 2001) ha mostrado que sólo conserva dos de los cinco Asp presentes en la zona de unión a Ca^{2+} del dominio C2 de la PKC α y su función es meramente estructural.

3.2.4. Región catalítica.

La región catalítica se localiza en el extremo carboxilo terminal de la PKC y su secuencia y estructura es muy similar a la de otras proteínas quinasas, como la proteína quinasa A (PKA) (Parker y col., 1986). No obstante, hay determinadas características estructurales específicas de la familia de las PKC. Por ejemplo, en todas las PKC existe un grupo de residuos ácidos conservados cerca de la entrada al sitio activo, el cual podría servir para el anclaje de tipo electrostático del dominio pseudosustrato en esa zona, permitiendo así la conformación inactiva de la enzima (Orr y Newton, 1994). Todas las isoenzimas de la PKC, menos la PKC μ , presentan una alta especificidad por péptidos que contienen aminoácidos básicos (Nishikawa y col., 1997). El modelo de la estructura de la región catalítica de la PKC β II está basado en la estructura tridimensional resuelta de la región catalítica de la PKA (Figura I.14) (Orr y Newton, 1994). La región catalítica también parece modular la afinidad de la PKC por la membrana y el Ca²⁺ (Edwards y Newton, 1997b).

La región catalítica está constituida por dos dominios: el dominio C3 de unión de ATP y el dominio C4 con actividad quinasa. El ATP unido al dominio C3 es quien aporta el grupo fosfato para la fosforilación del sustrato en el dominio C4.

El dominio C3 contiene la zona de unión de ATP con una secuencia (XGXGX₂GX₁₆KX, donde X puede ser cualquier aminoácido) conservada en muchas proteínas quinasas (Kemp y Pearson, 1990; Taylor y col., 1990; Orr y Newton, 1994; Newton, 1995b) y altamente conservada en todas las isoenzimas humanas de la PKC. Por ejemplo, entre las isoenzimas clásicas α y β de la PKC sólo existen cuatro aminoácidos diferentes y sólo dos si se comparan las isoenzimas atípicas ι y ζ . La mutación de este sitio de enlace a ATP inhibe por completo la actividad quinasa (Ohno y col., 1990).

El dominio C4 contiene dos regiones, la zona de unión del sustrato y la zona de transferencia de fosfato. La región de unión del sustrato determina la especificidad por el mismo, aunque también se ha propuesto que la región de unión a ésteres de forbol (el dominio C1) y la región de unión de ATP (el dominio C3) pueden contribuir a la especificidad por sustrato (Pears y col., 1991). El elemento central en la región de transferencia de fosfato (DFG) se encuentra altamente conservado en

todas las isoenzimas humanas de la PKC y en muchas otras quinasas (Taylor y col., 1990; Kemp y Pearson, 1990). Sólo las isoenzimas ι y ζ de la PKC presentan una pequeña diferencia, que se caracteriza por la sustitución de la Phe de la secuencia consenso por una Tyr (Ono y col., 1989). Además, el dominio C4 contiene un residuo fosforilable que interviene en la regulación de la actividad de la PKC y se encuentra conservado en todas las isoenzimas (Parekh y col., 2000). Este residuo es una Thr y se localiza en el llamado bucle de activación a la entrada del sitio activo. En la PKC α , este sitio de fosforilación es la Thr497 (Cazaubon y col., 1994), mientras que en la PKC β es la Thr500 (Orr y Newton, 1994). En el caso de la PKC β II, parece que cuando la Thr500 se fosforila, interacciona con los residuos Arg465 y Lys489, localizados también en el bucle de activación y cercanos al residuo Asp466, propuesto como la base catalítica (Orr y Newton, 1994) (Figura I.14).



Figura I.14. Modelo de la estructura de la región catalítica de la PKC β II. Se muestra el modelo propuesto por Orr y Newton (1994), donde aparecen la molécula de ATP unida (blanco), el dominio pseudosustrato (verde) con la Ala no fosforilable (naranja) y el grupo de residuos ácidos, implicados en mantener el pseudosustrato en el sitio activo (azul oscuro). También se muestran los residuos Thr500 (rosa) y Arg465 y Lys489 (azul claro), localizados en el bucle de activación.

3.2.5. Regiones variables.

Se pueden encontrar hasta cinco regiones variables dependiendo de la isoenzima (Figura I.1), las cuales juegan también un papel muy importante en la regulación y en la funcionalidad de la PKC.

La región variable V1 se localiza en el extremo amino terminal de la secuencia y a veces se identifica con el dominio C2 de las isoenzimas nuevas de la PKC. Desempeña un papel importante en la especificidad de la enzima por el sustrato (Mochly-Rosen y col., 1992; Johnson y col., 1996; Csukai y col., 1997; Hundle y col., 1997; Zhang y col., 1997). Esta región V1 no está conservada en todas las isoenzimas, lo cual puede influir en la selección del sustrato y en que cada isoenzima tenga sustratos específicos que no puedan ser fosforilados por el resto de miembros de la familia (Schaap y col., 1990; Pears y col., 1991; Zidovetzki y Lester, 1991). Parece ser que el enlace de las isoenzimas nuevas de la PKC a los receptores tipo RACK se realiza a través de esta región V1. Fragmentos de la secuencia de esta región V1 previenen la traslocación de la enzima después de ser estimuladas con éster de forbol (Sossin y Schwartz, 1993). La proteína ENH interacciona a través de la región V1 con la PKC α y la PKC β (Kuroda y col., 1996).

La región V3 o región bisagra es una zona muy flexible (Flint y col., 1990) que separa la región reguladora de la catalítica y posee una secuencia sensible a la rotura proteolítica por una proteasa (tripsina o calpaína), sobre todo cuando la enzima está unida a membrana (Kishimoto y col., 1983; Huang y Huang, 1986; Schaap y col., 1990; Newton, 1993). Esta proteólisis puede generar una enzima activa de forma constitutiva (Tapley y Murray, 1985; Melloni y col., 1986).

Finalmente, la región V5 es un fragmento con unos 50 aminoácidos situado en el extremo carboxilo terminal de la PKC y que posee una función reguladora importante de la actividad la PKC, debido quizás a su proximidad con el dominio catalítico (Bornancin y Parker, 1997; Edwards y Newton, 1997b) y a que contiene dos sitios de autofosforilación que participan en la regulación por fosforilación de la actividad de la PKC (Parekh y col., 2000). La gran importancia de esta región variable V5 queda reflejada claramente en la PKC β . Esta isoenzima presenta dos isoformas diferentes (β I y β II), producidas a partir del mismo gen por el

procesamiento alternativo del ARN en su maduración y que difieren solamente en esta región. Esta diferencia provoca que cada una presente una regulación diferente (Keranen y Newton, 1997) e, incluso, una localización celular diferente (Kiley y Parker, 1995). Estudios con la línea celular monocítica humana U937 han demostrado que mientras la PKC β I se localiza en los microtúbulos, la PKC β II se presenta en gránulos de secreción (Kiley y Parker, 1995). Se han descrito también diferentes interacciones proteína-proteína a través de esta región V5, entre las que destacan el enlace de la PKC β II a F-actina y el enlace de la PKC ζ a ASIP (proteína de interacción específica con isoenzimas atípicas de la PKC) (Blobe y col., 1996; Izumi y col., 1998).

3.3. Regulación de la PKC.

En la regulación de la PKC intervienen multitud de factores que, básicamente, se pueden clasificar en tres grandes niveles: la unión de la PKC a diferentes cofactores (entre ellos, la membrana y el Ca²⁺), el estado de fosforilación de la proteína y la localización celular de la misma. Todos estos procesos conducirán a la activación de la enzima, aunque el mecanismo por el cual se produce dicha activación no se conoce por completo. Además, cada isoenzima puede tener un mecanismo de activación diferente e incluso presentar múltiples procesos activadores, por lo que el estudio detallado de la regulación de la PKC es muy complejo.

3.3.1. Regulación por cofactores lipídicos.

La membrana presenta una amplia diversidad de especies lipídicas, las cuales poseen una elevada y a veces específica capacidad para modular la función biológica de las membranas mediante distintos efectos sobre proteínas que interaccionan con ellas de forma constitutiva o transitoria (Newton, 1993).

Como ya se ha comentado anteriormente, la activación de la PKC requiere el desplazamiento del dominio pseudosustrato autoinhibidor del sitio activo de la enzima. Este cambio conformacional ocurre básicamente mediante la unión de alta

especificidad de DAG y fosfolípidos aniónicos a los dos dominios de unión a membrana de la PKC, el dominio C1 y el dominio C2, respectivamente. A pesar de que la unión de ligando a cualquiera de estos dos dominios es suficiente para localizar la proteína en la membrana con una interacción de baja afinidad, es necesario que ambos dominios estén unidos a la membrana para que la interacción sea de alta afinidad y se produzca así el desplazamiento del dominio pseudosustrato, con la consecuente activación máxima de la enzima (Newton, 1995; Newton, 1997; Oancea y Meyer, 1998).

3.3.1.1. *Diacilglicerol y ésteres de forbol.*

El DAG duplica la eficiencia catalítica de la enzima unida a fosfatidilserina (Hannun y col., 1986; Mosior y Epan, 1993; Newton y Keranen, 1994) y estimula la activación promovida por ácidos grasos (Nishizuka, 1995) y por fosfatidilcolinas de cadena corta (Walker y Sando, 1988). Al igual que el DAG, los ésteres de forbol también aumentan la afinidad de la PKC por Ca^{2+} (Castagna 1982; Yamanishi y col., 1983). No obstante, a diferencia de los DAG, los ésteres de forbol se metabolizan más lentamente (Nishizuka, 1986) e interaccionan más fuertemente con la PKC (Mosior y Newton, 1996). Son capaces de promover fácilmente la formación de tumores y sustituir al DAG en la activación de la PKC (Castagna, 1982; Ashendel, 1985).

La activación de la PKC por DAG muestra una elevada estereoespecificidad, la cual depende tanto del grupo principal como de las cadenas acílicas del DAG (Rando y Kishi, 1992). La importancia del grupo hidroxilo se pone de manifiesto en que la sustitución del mismo por grupos de tipo éter, halógeno, metiléster o tiol producen compuestos análogos a los DAG incapaces de activar a la PKC. De igual manera, los enlaces ésteres de los ácidos grasos también son necesarios para la actividad (Ganong y col., 1986; Molleyres y Rando, 1988), así como la posición de las cadenas acílicas, pues los isómeros 1,3-*sn*-DAG y 2,3-*sn*-DAG son inactivos (Osada y col., 1990; Sanchez-Piñera y col., 1999). De esta forma, la enzima presenta especificidad por el isómero 1,2-*sn*-DAG (Rando y Young, 1984; Boni y Rando, 1985; Nomura y col., 1986; Sánchez-Piñera y col., 1999a). La longitud de las cadenas acílicas y su grado de saturación también afectan al enlace y actividad de la PKC α . Mediante diversos estudios biofísicos se ha demostrado que la actividad

enzimática se ve favorecida por perturbaciones específicas de la bicapa lipídica que pueden estar producidas por cadenas alifáticas con insaturaciones o por grupos principales demasiado grandes o demasiado pequeños (Israelachvili y col., 1980; Gruner, 1985; Romero y col., 1987; Sen y col., 1991). La presencia de cadenas acílicas saturadas y largas hace que se produzcan numerosas interacciones que tienden a estabilizar la estructura de la bicapa, mientras que los dobles enlaces en *cis*, presentes en ácidos grasos como el oleico, tienen el efecto contrario. De esta forma, los DAG con cadenas insaturadas activan mejor a la PKC, mientras que los DAG de cadenas largas y saturadas no la activan (Kishimoto y col., 1980; Mori y col., 1982; Jiménez-Monreal y col., 1999; Micol y col., 1999; Torrecillas y col., 2001). El 1,2-*sn*-DAG desempeña un papel muy importante al aumentar la afinidad de la PKC por la fosfatidilserina (Newton, 1993; Newton y Keranen, 1994; Lue y col., 1995) y permite la activación sostenida de la enzima pues evita que el dominio pseudosustrato vuelva a enlazarse al dominio catalítico (Oancea y Meyer, 1998).

Si bien el DAG no se encuentra normalmente presente en las membranas en reposo (Kikkawa y Nishizuka, 1986), la estimulación de los receptores de la superficie celular mediante señales extracelulares provoca, entre otros efectos, la activación de la fosfolipasa C que hidroliza distintos fosfolípidos, como el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), produciendo así DAG. No obstante, este DAG desaparece rápidamente, aunque, en ocasiones, el nivel de DAG vuelve a aumentar paulatinamente y persiste durante más tiempo. Esta segunda aparición de DAG es debida a la hidrólisis de la fosfatidilcolina mediante la misma fosfolipasa C (Lee y col., 1991; Holbrook y col., 1992; Lassegue y col., 1993; Jarpe y col., 1994). La desaparición inicial del DAG producido a partir de la hidrólisis de PIP₂, se debe a la acción de la DAG quinasa, que convierte el DAG rápidamente a ácido fosfatídico. En cambio, el DAG producido a partir de la fosfatidilcolina es mal sustrato de la DAG quinasa y es degradado más lentamente por la DAG lipasa (Ford y Gross, 1990; Lee y col., 1991).

A pesar de que el dominio C1 no une Ca²⁺, en el caso de las isoenzimas clásicas de la PKC parece existir una relación sinérgica entre el Ca²⁺ y los DAG/ésteres de forbol, ya que la presencia de Ca²⁺ aumenta la afinidad de la PKC por fosfatidilserina, dando lugar a que se requiera menor unión de ligandos al dominio C1 para efectuar la unión a membrana (Luo y col., 1995). Asimismo, como

ya se ha comentado, la presencia de DAG/ésteres de forbol incrementa la afinidad de la PKC por fosfatidilserina (Newton, 1993; Newton y Keranen, 1994; Lue y col., 1995), de modo que la cantidad de Ca^{2+} necesaria para la activación dependiente de fosfatidilserina es menor (Nishizuka, 1984). Por otro lado, estudios recientes han demostrado una importante relación entre los dominios C2 y C1 de la PKC α (Conesa-Zamora y col., 2000; Bolsover y col., 2003). Así, una vez que el dominio C2 ha enlazado Ca^{2+} e interacciona con los fosfolípidos de la membrana, el dominio C1 de la PKC α puede acceder al DAG generado en la membrana y dar lugar así a la forma activa de la enzima (Bolsover y col., 2003).

3.3.1.2. Lípidos aniónicos y Ca^{2+} .

La PKC se une a membranas con fosfolípidos aniónicos en ausencia de DAG con el único requerimiento de la carga negativa (Bazzi y Nelsestuen, 1987; Lee y Bell, 1989; Orr y Newton, 1992). Sin embargo, en presencia de DAG se produce un incremento notable de la especificidad por membranas que presentan fosfatidilserina, cuya afinidad aumenta en un orden de magnitud con respecto a otros fosfolípidos aniónicos, lo cual está acompañado por la retirada del pseudosustrato de la región catalítica y la consiguiente activación enzimática (Newton, 1993; Newton, 1995; Newton, 1997). Diversos estudios con bicapas, monocapas y micelas han demostrado que la PKC requiere fosfatidilserina para su actividad óptima (Kaibuchi y col., 1981; Boni y Rando, 1985; Hannun y col., 1985; Souvignet y col., 1991). Además diferentes trabajos realizados con la proteína entera y con el dominio C2 aislado de la PKC α , han demostrado que el dominio C2 está implicado en el enlace a fosfatidilserina tanto *in vivo* como *in vitro* (Edwards y Newton, 1997a; Medkova y Cho, 1998b; Corbalán-García y col., 1999). De hecho, se ha identificado el sitio de enlace a fosfatidilserina en el dominio C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2001).

Para la activación de la PKC se observa una elevada especificidad por el grupo de L-serina, de forma que alteraciones estereoquímicas de este grupo o la eliminación de uno o más de sus grupos funcionales, producen fosfolípidos incapaces de activar a la PKC. Asimismo, la distancia entre el grupo fosfato y estos grupos funcionales también es crítica (Lee y Bell, 1989). No obstante, otros lípidos

aniónicos como el ácido fosfatídico, el fosfatidilglicerol o el fosfatidilinositol son capaces de reducir el número de moléculas de fosfatidilserina necesarias para la actividad total de la enzima aunque con menor afinidad (Newton y Koshland, 1987; Lee y Bell, 1991; Lee y Bell, 1992). A pesar de esta especificidad en cuanto a la actividad de la PKC, se ha observado que la PKC se enlaza a distintos lípidos aniónicos, mostrando sólo el requerimiento de la carga negativa del grupo funcional (Bazzi y Nelsestuen, 1987; Lee y Bell, 1989; Orr y Newton, 1992). De esta forma, existen lípidos no activadores de la PKC que son capaces de unirse a la enzima (Orr y Newton, 1992). No obstante, el ácido fosfatídico es capaz de contribuir a la activación y al enlace de un éster de forbol (PDBu) a la enzima durante los procesos de transducción de señales (Lee y Bell, 1989).

El Ca^{2+} incrementa la afinidad de las isoenzimas clásicas de la PKC por lípidos aniónicos sin la intervención del dominio C1 (Hannun y col., 1985; Bazzi y Nelsestuen, 1987; Bazzi y Nelsestuen, 1990; Newton y Keranen, 1994). Este incremento de afinidad por la membrana dependiente de Ca^{2+} se observa en presencia de cualquier fosfolípido aniónico, por lo que el principal requisito no es la cabeza polar del fosfolípido sino la presencia de carga negativa (Newton y Keranen, 1994). De esta forma, no sólo la fosfatidilserina sino también otros fosfolípidos de carácter aniónico, como el fosfatidilglicerol, el PIP_2 y el ácido fosfatídico, son capaces de activar a la PKC en presencia de Ca^{2+} (Bazzi y Nelsestuen, 1987; Lee y Bell, 1991; Newton, 1993). El Ca^{2+} también estabiliza el complejo formado entre la proteína y el lípido (Lester y col., 1990). La presencia de Ca^{2+} provoca la retirada del pseudosustrato del sitio catalítico, permitiendo así la accesibilidad del DAG a su sitio de enlace en el dominio C1 y la consecuente interacción con la membrana (Oancea y Meyer, 1998). La concentración de Ca^{2+} precisa para el enlace de la PKC a la membrana es bastante menor que la requerida para la activación de la enzima. Se ha propuesto que las concentraciones de Ca^{2+} mayores que las necesarias para el enlace dan lugar a un cambio conformacional en la PKC que conlleva la retirada del pseudosustrato de la región catalítica y la posterior activación (Keranen y Newton, 1997).

En numerosos estudios de actividad de la PKC, en presencia de fosfatidilserina, Ca^{2+} saturante y DAG, se han obtenido curvas de tipo sigmoidal, con coeficientes de Hill que sugieren que varias moléculas de fosfatidilserina

interaccionan con la PKC (Hannun y col., 1985; Newton y Koshland, 1989; Burns y col., 1990; Orr y Newton, 1992; Mosior y Epanand, 1993; Newton y Keranen, 1994). En presencia de DAG, la afinidad por los sitios de la fosfatidilserina se incrementa, por lo que la probabilidad de que se una un mayor número de moléculas también aumenta (Newton, 1993). De hecho, estudios posteriores de interacción de la PKC β II con vesículas unilamelares grandes ha determinado que ocho moléculas de fosfatidilserina interaccionan con la enzima (Mosior y Newton, 1998).

Existen otros lípidos además de la fosfatilserina que pueden estimular la activación de la PKC dependiente de DAG. Por ejemplo, se ha caracterizado la estimulación por ácidos grasos, sobre todo por el ácido araquidónico (Khan y col., 1995), así como la estimulación por el ácido lisofosfatídico (Sando y Chertihin, 1996) o bien por lípidos muy ácidos como los fosfoinositoles (Newton, 1997). Estudios recientes han demostrado que el PIP₂ se une al dominio C2 de la PKC en dos lugares diferentes: una región rica en Lys situada entre las cadenas β 3 y β 4, al igual que ocurre en otras proteínas como la sinaptotagmina (Schiavo y col., 1996) o la rabfilina (Chung y col., 1998), y la bien conocida región de unión a Ca²⁺ y fosfatidilserina (Corbalán-García y col., 2003). Inicialmente se pensó que la activación por PIP₂ se debía a la capacidad de la elevada carga negativa de esta molécula, y de los fosfatidilinositoles en general, para interaccionar con los sitios del dominio C2 responsables del enlace a lípidos aniónicos (Palmer y col., 1995b). No obstante, se ha comprobado que la activación de la PKC mediante PIP₂ tiene lugar a través de la región rica en Lys situada entre las cadenas β 3 y β 4 del dominio C2 y que requiere un orden secuencial de acontecimientos determinado. Así, en la PKC en estado inactivo, este sitio de interacción con el PIP₂ en el dominio C2 no está accesible, siendo necesario que la proteína adopte una conformación abierta tras la unión de Ca²⁺ para que este fosfolípido pueda interaccionar con dicha región rica en Lys (Corbalán-García y col., 2003).

3.3.1.3. Otros compuestos lipídicos.

Otros compuestos lipídicos como los éteres lipídicos, los retinoides o ciertos ácidos grasos insaturados puede influir sobre la actividad de la PKC.

Los *ésteres lipídicos antitumorales* son capaces de producir apoptosis (Diomedea y col., 1993; Mollinedo y col., 1993), aunque el mecanismo por el cual actúan no es del todo conocido. El lugar de actuación más probable de los ésteres lipídicos antitumorales es la membrana plasmática (Kiss y Crilly, 1997). De hecho, inhiben varias actividades muy importantes asociadas con las membranas como la síntesis *de novo* de la fosfatidilcolina (Boggs y col., 1995), la actividad de la Na^+K^+ -ATPasa (Zheng y col., 1990; Diomedea y col., 1992), la unión del factor de crecimiento epidérmico (Kosano y Takatani, 1988), la liberación de ácido araquidónico por la fosfolipasa A_2 (Parker y col., 1987), la actividad de la fosfolipasa C (Powis y col., 1992) y también la actividad de la PKC (Vogler y col., 1991; Gil y col., 1996). Algunos autores proponen que la edelfosina (prototipo de los ésteres lipídicos) inhibe la actividad de la PKC compitiendo con la fosfatidilserina por los sitios de enlace a la PKC (Grunicke y col., 1989; Überall y col., 1991; Daniel y col., 1995; Gil y col., 1996). Sin embargo, otros autores han demostrado que estos ésteres son capaces de inhibir la traslocación de la PKC a la membrana inducida por ésteres de forbol, de forma que relacionan su efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima con su capacidad para interferir en la unión de la PKC con componentes de las membranas como el DAG o la fosfatidilserina (Salari y col., 1992). Sin embargo, son muchas las evidencias que demuestran que estos ésteres no compiten con el sitio de enlace de la PKC a DAG o a PMA (Shoji y col., 1988; Zheng y col., 1990; Überall y col., 1991). Por otro lado, otros estudios han demostrado que el efecto de la edelfosina sobre la actividad del enzima depende del modo de adición. De esta forma, cuando la edelfosina se añade en una solución de etanol, inhibe la actividad de la PKC, mientras que si se añade en liposomas conjuntamente con fosfatidilserina y DAG el efecto es el de activación (Heesbeen y col., 1991). También se observan diferentes efectos sobre la actividad de la PKC si la enzima está asociada a membranas o está solubilizada en detergente (Heesbeen y col., 1994). Un trabajo reciente ha demostrado que en presencia de membranas modelo con concentraciones variables de éter se obtiene tanto activación como inhibición de la $\text{PKC}\alpha$ (Aroca y col., 2001). Estos resultados parecen estar relacionados con el efecto que produce las distintas concentraciones de éter sobre la estabilidad y la estructura de la bicapa lipídica, ya que existe una correlación entre la solubilización y desestabilización de las bicapas lipídicas por efecto de elevadas concentraciones de éter con la activación de la $\text{PKC}\alpha$ (Aroca y col., 2001).

Los *compuestos retinoides* incluyen una serie de compuestos naturales derivados de la vitamina A como el retinol, el retinal y el ácido retinoico. La estructura de estos compuestos es muy similar entre sí y sólo difiere en el extremo polar. Regulan el crecimiento celular y procesos de diferenciación, desarrollo y apoptosis (De Luca, 1991; Gudas, 1994). Los retinoides, a través de los receptores nucleares del ácido retinoico, controlan la expresión génica y la síntesis de proteínas y están implicados directamente en la regulación de diferentes elementos implicados en la señalización celular como la PKC (Fontana y col., 1986; Isakov, 1988; Hendrix y col., 1990; Chambon, 1994; Hsu y col., 1999). Por ejemplo, algunas interacciones de los retinoides con distintas isoenzimas de la PKC participan en los mecanismo de reversión de células malignas (Fontana y col., 1986; Isakov, 1988; Cho y col., 1997). Aunque inicialmente se propuso que los retinoides no compiten con el sitio de unión a ésteres de forbol de la PKC (Cope y col., 1986), estudios más recientes han identificado que las regiones ricas en cisteínas de los dominos reguladores de Raf y PKC pueden actuar como receptores de retinoides (Hoyos y col., 2000). En concreto, el ácido retinoico, por su parte, altera la localización celular e inhibe la activación de la PKC (Carter y col., 1998). En un reciente estudio comparativo de secuencias se ha propuesto un posible sitio de enlace a ácido retinoico en el dominio C2 de la PKC α y se ha demostrado que el ácido retinoico se enlaza a la PKC y que es capaz de inhibir su actividad quinasa (Radominska-Pandya y col., 2000). Sin embargo aún no se sabe hasta qué punto el efecto de los retinoides sobre la PKC es a través de las modificaciones que éstos inducen en las membranas o si son efectos directos.

Algunos *ácidos grasos insaturados* como el ácido araquidónico y el ácido oleico provocan la traslocación a la membrana (Shirai y col., 1998) y la activación de la PKC independiente de PS o DAG (McPhail y col., 1984; Murakami y col., 1986; Sekiguchi y col., 1987; El Touny y col., 1990). Ya que esta activación es estimulada por Ca²⁺, algunos estudios sugieren la intervención del dominio C2 (Shinomura y col., 1991; Chen y Murakami, 1992).

3.3.1.4. Propiedades de la membrana.

Las propiedades estructurales de la membrana también ejercen una influencia importante sobre la actividad de la PKC. Por ejemplo, la actividad de la PKC es

sensible al grado de saturación de las cadenas acílicas, de forma que la presencia de insaturaciones aumentan la actividad de la enzima (Bolen y Sando, 1992). Así, membranas compuestas únicamente por fosfolípidos saturados, con fosfatidilserina y DAG, activan en menor medida a la PKC (Micol y col., 1999; Torrecillas y col., 2001), mientras que la presencia de una insaturación en un fosfolípido en la bicapa, no necesariamente fosfatidilserina, da lugar a una membrana con una mayor capacidad de activación de la PKC. La presencia de la insaturación en el fosfolípido de la membrana parece que produce alteraciones en el espaciamiento de los grupos de cabeza en lugar de incrementar la fluidez de la membrana. Así, por ejemplo, la actividad de la PKC aumenta en condiciones en las que el colesterol disminuye la fluidez de la membrana (Bolen y Sando, 1992; Slater y col., 1994).

Por otro lado, el estado físico de la membrana también influye en la actividad de la PKC. Utilizando POPS y 1,2-*sn*-POG se ha observado que, al aumentar la concentración de este DAG, la actividad máxima de la PKC α se obtiene cuando la membrana se encuentra en fase fluida, situación en la que además la energía de activación es menor a una determinada concentración de POG (Jiménez-Monreal y col., 1999).

La presencia de lípidos que no forman fases lamelares es otro de los factores que influyen en la actividad de la PKC, en concreto, incrementado dicha actividad (Epanand, 1998). De esta forma, la actividad de la PKC es sensible a la fosfatidiletanolamina, la cual forma estructuras de membrana no lamelares a altas fracciones molares, de manera similar al DAG (Mosior y col., 1996; Senisterra y Epanand, 1993). Se ha sugerido que la tendencia a formar fases no lamelares crea un estado físico en la membrana que favorece la activación de la PKC.

La actividad de la PKC es también sensible a la formación de microdominios ricos en DAG (Dibble y col., 1996; Hinderliter y col., 1997) o dominios ricos en fosfatidilserina (Yang y Glaser, 1995), los cuales estimulan la actividad de la enzima. Parece ser que la estructura de membrana correspondiente a una mezcla del complejo DAG/fosfolípido y de fosfolípido libre tiene una mayor capacidad para estimular la actividad de la PKC que el complejo DAG/fosfolípido solo (Micol y col., 1999).

La alteración de la curvatura de la membrana debido a la presencia de compuestos como ácidos grasos libres y DAG también puede modular la actividad de la PKC (Goldberg y Zidovetzki, 1998). Además, la actividad enzimática puede modularse mediante moléculas que se intercalan en la membrana, como anestésicos, alcoholes y antineoplásicos (Slater y col., 1993; Sánchez-Piñera y col., 1999b).

Es evidente entonces, que a pesar del hecho de que la enzima tiene sitios específicos de enlace para el DAG y la fosfatidilserina, la localización y presentación óptima de los mismos por parte de la membrana facilita su reconocimiento por la PKC.

3.3.2. Regulación por fosforilación.

La fosforilación de la PKC, aparte de la presencia de cofactores, es necesaria para su regulación y activación (Flindt y col., 1990; Newton, 1995; Patel y Stabel, 1989; Borner y col., 1989; Zhang y col., 1994). De hecho, el estado defosforilado de la enzima es inactivo (Borner y col., 1988; Dutil y col., 1994; Keranen y col., 1995). Incluso la proteína purificada puede ser inactivada mediante tratamiento con fosfatasas (Pears y col., 1992).

La PKC recién sintetizada es inactiva y está asociada a la fracción celular insoluble en detergente (Borner y col., 1989). La fosforilación de tres posiciones en su extremo carboxilo terminal de la región catalítica, concretamente en unos residuos de Thr y Ser conservados, es necesaria para la adquisición de una conformación catalíticamente competente y soluble en el citosol (Keranen y col., 1995; Tsutakawa y col., 1995). Una de esas posiciones constituye un sitio de transfosforilación y se localiza en el llamado bucle de activación cercano a la entrada del sitio activo (sitio de fosforilación del bucle de activación), mientras que las otras dos son sitios de autofosforilación que se localizan en una zona hidrofóbica de unos 19 aminoácidos de la región V5.

Concretamente, el primer suceso necesario para la activación de la PKC es la transfosforilación del sitio del bucle de activación. En el caso de las isoenzimas clásicas de la PKC, este sitio se corresponde con la Thr497 para la PKC α (Cazaubon

y col., 1994) y a la Thr500 para la PKC β II (Orr y Newton, 1994). Este sitio de fosforilación parece que interviene en la alineación correcta del sitio catalítico de la enzima para su activación (Knighton y col., 1991; Keranen y col., 1995; Tsutakawa y col., 1995). Modelos estructurales propuestos para la PKC α y la PKC β sugieren una función del sitio de fosforilación en el bucle de activación equivalente al de la PKA, donde también está conservado en la posición de la Thr497 (Orr y Newton, 1994; Srinivasan y col., 1996). La responsable de esta fosforilación parece ser la proteína quinasa dependiente de fosfatidilinositoles (PDK1) y puede fosforilar a las isoenzimas clásicas de la PKC, como la PKC α y la PKC β II (Dutil y col., 1998), a las isoenzimas nuevas, como la PKC δ (Le Good y col., 1998) y a las isoenzimas atípicas, como la PKC ζ (Le Good y col., 1998; Chou y col., 1998)

El siguiente paso de la activación de la PKC, tras la fosforilación del bucle de activación mediada por la PDK-1, supone la autofosforilación de los otros dos sitios localizados en la región V5, lo cual conduce a una enzima catalíticamente competente. Estos dos sitios se corresponden con la Thr638 (Bornacin y Parker, 1996) y Ser657 (Bornacin y Parker, 1997) para la PKC α , y para la PKC β II con la Thr641 (Thr642 para la PKC β I) (Flint y col., 1990) y la Ser660 (Keranen y col., 1995; Tsutakawa y col., 1995). Se ha demostrado que el primero de estos sitios de autofosforilación es fundamental para la actividad enzimática de la PKC β II (Keranen y col., 1995), de la PKC β I (Zhang y col., 1994) y de la PKC δ (Li y col., 1997). En el caso de la PKC α , a pesar de que la fosforilación de la Thr638 no es necesaria para su actividad catalítica, sí tiene un efecto estabilizador y favorece la conformación cerrada de la región catalítica, lo cual es importante para la duración de la actividad y la velocidad de desfosforilación de la enzima (Bornacin y Parker, 1996). El segundo de estos sitios de fosforilación en la PKC β II (Ser660) es importante para el plegamiento correcto de la enzima y tiene una función reguladora de la unión de sustrato, ATP y Ca²⁺ (Edwards y Newton, 1997b). La fosforilación del mismo residuo en la PKC α (Ser657) es importante, sin embargo, para mantener a la enzima completamente fosforilada en una conformación cerrada que es resistente a fosfatasas (Bornacin y Parker, 1997).

Se ha comprobado, mediante la comparación de las secuencias de aminoácidos, que todas las isoenzimas de PKC presentan tres residuos conservados

equivalentes a los sitios de fosforilación de la PKC α y la PKC β , excepto las isoenzimas atípicas PKC ι y ζ , las cuales presentan en lugar del residuo equivalente a la Ser660, un residuo de Glu (Hofmann, 1997; Bornancin y Parker, 1997). Por otro lado, la isoenzima PKC μ tiene los tres sitios fosforilables, pero el residuo equivalente a la Thr500 está reemplazado por una Ser y la Ser660 por una Thr (Hofmann, 1997).

A pesar del elevado grado de conservación de estos sitios de fosforilación, existen diferencias en cuanto a la regulación y relevancia de estas fosforilaciones en las isoenzimas nuevas y atípicas de la PKC. Por ejemplo, cuando la PKC δ es expresada en bacterias, a pesar de que el sitio de fosforilación en el bucle de fosforilación (Thr505) y el de la región hidrofóbica del extremo carboxilo terminal (Ser660) están desfosforilados, la enzima retiene parte de su actividad catalítica. Además también se ha demostrado que el residuo Thr505 no es necesario para la actividad de esta enzima (Stempka y col., 1997).

Aparte de estos sitios de fosforilación comunes, pueden existir otros no conservados que proporcionan mecanismos de regulación específica para distintas isoenzimas de la PKC. Así, se ha demostrado que la PKC δ puede fosforilarse en residuos de Tyr (entre ellos la Tyr187) en respuesta a numerosos estímulos (Li y col., 1994; Haleem-Smith y col., 1995; Soltoff y Toker, 1995; Denning y col., 1996; Li y col., 1996; Song y col., 1998) y que todas las isoenzimas pueden fosforilarse en residuos de Tyr en respuesta a estrés oxidativo producido por el H₂O₂, lo cual lleva a una activación prolongada de la PKC (Konishi y col., 1997).

3.3.3. Regulación por localización.

Las isoenzimas de la PKC se localizan en distintos compartimentos subcelulares, como se puede deducir de distintos análisis inmunocitoquímicos (Jaken, 1996). La localización específica de la PKC probablemente sea crucial para su capacidad de responder eficientemente a segundos mensajeros y para estar preparada para acceder a los distintos sustratos de forma rápida (Newton, 1997). En este sentido se ha observado que la PKC puede interaccionar con diferentes proteínas, que no son sustratos de la misma, y que dichas interacciones pueden tener

un papel importante en la localización intracelular y función de las distintas isoenzimas de la PKC (Mochly-Rosen y col., 1991a; Mochly-Rosen y col., 1991b).

Un ejemplo de este tipo de proteínas es el de los RACK (receptores para quinasas C activadas), un grupo de proteínas que se unen a la conformación activa de la PKC (Mochly-Rosen y col., 1991a; Mochly-Rosen y col., 1991b). Estas proteínas se enlazan a las isoenzimas de la PKC activadas de manera selectiva y saturable, sin que la presencia de sustrato para la PKC tenga un efecto inhibitor (Mochly-Rosen y col., 1991a). Se ha demostrado que la interacción de la PKC con los RACK ocurre, al menos en parte, a través del dominio C2 (Mochly-Rosen y col., 1992; Mochly-Rosen y col., 1995; Ron y col., 1995; Csukai y col., 1997). Se han identificado dos de estas proteínas, el RACK1 y el RACK2 (β' -COP), las cuales incrementan la capacidad de la PKC de fosforilar sustratos. El RACK1 interacciona específicamente con la PKC β II (Ron y col., 1994; Ron y col., 1995). De hecho, el péptido análogo a la región del dominio C2 de la PKC β que interacciona con este RACK1, bloquea la traslocación de la PKC a la membrana plasmática inducida por ésteres de forbol (Ron y col., 1995). Por otro lado, el RACK2 (β' -COP) interacciona específicamente con la PKC ϵ (Csukai y col., 1997). Otras proteínas cuyas características son similares a las de las proteínas RACK son la proteína perinuclear y la F-actina. La primera interacciona con la proteína C quinasa (PICK1) de localización perinuclear y se enlaza al fragmento catalítico de la PKC α (Staudinger y col., 1995), mientras que la F-actina se enlaza selectivamente al dominio C1 de la PKC ϵ (Prekeris y col., 1996).

Por otro lado, las isoenzimas inactivas de la PKC interaccionan con receptores de quinasas C inactivas (proteínas RICK) (Mochly-Rosen y Gordon, 1998). Entre estas proteínas RICK encontramos proteínas relacionadas con el citoesqueleto como la proteína 14-3-3 (Xiao y col., 1995) y la familia de las proteínas de anclaje de la quinasa A (AKAP), que también se enlazan a las isoenzimas de la PKC regulando su localización subcelular (Dell'Aqua y col., 1998).

El enlace alternativo de las proteínas RACK y RICK a las isoenzimas de la PKC se debe a que mientras que la PKC en conformación inactiva expone el sitio de enlace a las RICK, en presencia de activadores de la PKC, la conformación cambia y el sitio de enlace a las RACK queda expuesto (Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

También se ha identificado un grupo de proteínas llamadas STICK que interaccionan con la PKC como sustratos y cuya fosforilación regula su asociación con la PKC. En este grupo se incluyen las proteínas MARCKS, las aducinas y la proteína clon72 (Fowler y col., 1998a; Fowler y col., 1998b; Chapline y col., 1996; Chapline y col., 1998).

Se han descrito dos proteínas que interaccionan con la PKC ζ y PKC λ denominadas p62/ZIP (Puls, y col., 1997; Sánchez y col., 1998) y LIP (Díaz-Meco y col., 1996), respectivamente, y que parecen estar implicadas en la localización de la enzima en determinados sitios intracelulares. Otra proteína que interacciona con las PKCs atípicas es la PAR-4 que está implicada en mecanismos de apoptosis (Díaz-Meco y col., 1996)

Adicionalmente se ha demostrado que la PKC puede interaccionar con otras proteínas del citoesqueleto, como la caveolina (Mineo y col., 1998); algunas proteínas de las AKAP antes citadas, como la proteína AKAP79 (proteínas que unen PKA) (Klauck y col., 1996; Faux y Scott, 1997) y la AKAP250 (Nauert y col., 1997); y la actina, que interacciona con el extremo carboxilo terminal de la PKC β II (Blobe y col., 1996). No obstante, existe cierta controversia sobre la traslocación de la PKC mediada por su asociación con proteínas del citoesqueleto. Así, mientras algunos estudios demuestran que este enlace se produce (Jaken y col., 1989; Goodnight y col., 1995), otros trabajos afirman que en la traslocación de la PKC γ y de la PKC α no intervienen componentes del citoesqueleto (Sakai y col., 1997; Almholt y col., 1999).

3.3.4. Modelo de activación de la PKC.

La PKC recién sintetizada se encuentra en estado inactivo, siendo necesaria su fosforilación por otra quinasa y su unión a la membrana para convertirla en una enzima activa. La Figura I.15 muestra un modelo propuesto para la activación de la PKC α (Gao y col., 2001; Bolsover y col., 2003).

Inicialmente, el dominio pseudosustrato de la PKC recién sintetizada se desplaza del sitio activo, permitiendo que la PDK-1 pueda acceder al sitio de

fosforilación del bucle de activación. Dicha transfosforilación permite que ocurran a continuación dos autofosforilaciones en el extremo carboxilo terminal, las cuales provocarán que el dominio pseudosustrato se una al sitio activo. Esta situación supone que la PKC se encuentra en un estado inactivo pero catalíticamente competente (Gao y col., 2001).

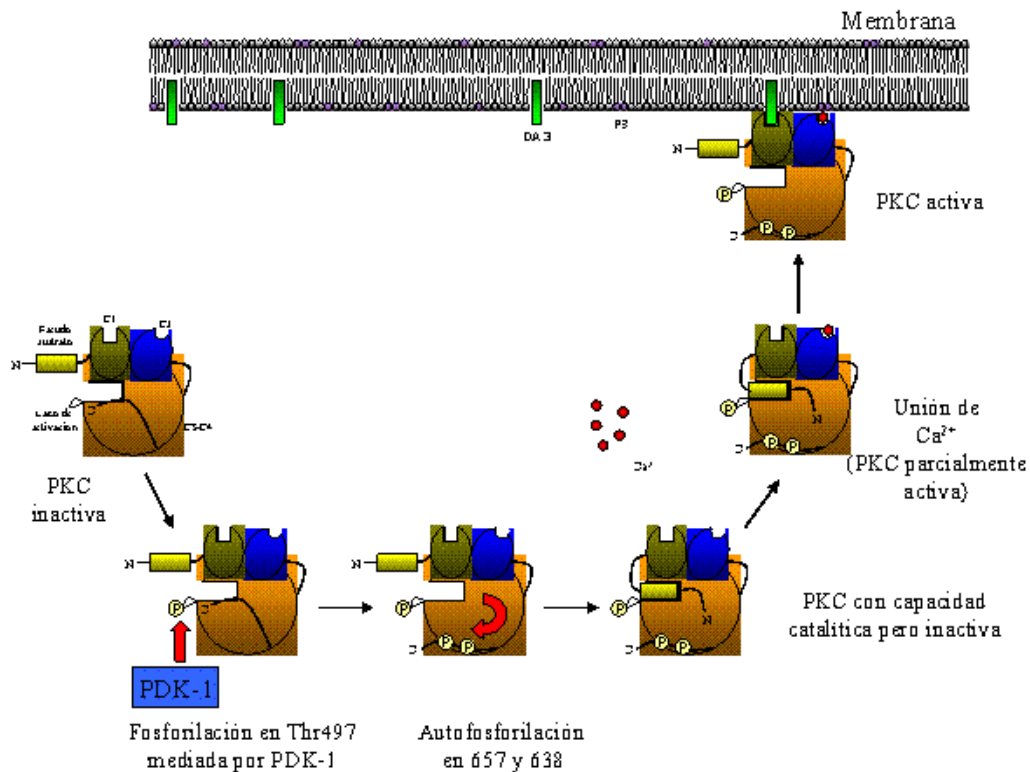


Figura I.15. Modelo de activación de la PKC. La PKC recién sintetizada es inactiva. La fosforilación de la PKC por la PDK-1 en el bucle de activación permite que ocurran dos autofosforilaciones que conducirán a la enzima a un estado inactivo pero catalíticamente competente, debido a que el dominio pseudosustrato ocupa el sitio activo. El Ca²⁺ se une al dominio C2 y se produce un cambio conformacional que da lugar a un complejo con alta afinidad por la membrana. Entonces, se produce una primera interacción con la membrana que se estabiliza, a continuación, con la unión al dominio C1 del DAG presente en la misma. La unión completa de la PKC a membrana a través de los dominios C1 y C2 podría provocar la salida del dominio pseudosustrato del sitio activo, completando así la activación de la enzima.

Debido a diferentes señales extracelulares que actúan a nivel de distintos receptores de membrana, se produce, entre otros efectos, la generación de DAG en la membrana y el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular. La unión de Ca²⁺ al dominio C2 de la enzima produce un aumento de la afinidad por la membrana y da lugar a un pequeño cambio conformacional en la enzima que permite su interacción

con la membrana. A continuación, el dominio C1 puede enlazarse con el DAG generado en la superficie de la membrana, liberando el dominio pseudosustrato del sitio activo y dando lugar al estado completamente activado de la PKC (Oancea y Meyer, 1998; Bolsover y col., 2003).

3.4. Función de la PKC.

La PKC está implicada en la transducción de señales extracelulares produciendo gran variedad de efectos sobre distintos procesos celulares en función de los sustratos que active. Los efectos producidos pueden ser a nivel celular o, incluso, a nivel de organismo completo, y entre los mismos se incluyen la desestabilización de receptores, cambios en la estructura de la membrana plasmática que producen modificaciones en su permeabilidad, regulación de la transcripción, mediación en la respuesta y memoria inmunológica y regulación del crecimiento celular (Asaoka y col., 1992; Nishizuka, 1986; Nishizuka, 1992; Dekker y Parker, 1994; Nishizuka, 1995).

Todos estos efectos son el resultado de diferentes cascadas de activación, en las que la PKC tiene un papel importante. La llegada de distintos estímulos extracelulares provoca la estimulación de los receptores de la superficie celular, lo cual inicia una cascada de degradación de varios constituyentes lipídicos de la membrana y muchos de los metabolitos que se forman pueden inducir, intensificar y prolongar la activación de la PKC. Una de las vías de activación de la PKC mejor conocidas es la acción de la fosfolipasa C (PLC) sobre la hidrólisis del PIP_2 . Cuando ciertas señales extracelulares interaccionan con los receptores específicos de la membrana plasmática, como por ejemplo los receptores tipo tirosina quinasa (TKR) o los asociados a proteína G, se activa la PLC y ésta hidroliza el PIP_2 , dando lugar a dos segundos mensajeros, el DAG y el IP_3 . El DAG queda asociado a la membrana y es un activador de la PKC. Por su parte, el IP_3 se libera al citosol y se une a receptores específicos del retículo endoplasmático, provocando la apertura de canales de calcio y permitiendo así su salida al citoplasma, de manera que la concentración de calcio citoplasmático aumenta de 10^{-8} M a 10^{-6} M, lo que también produce la activación de la PKC (Nishizuka, 1995) (Figura I.16).

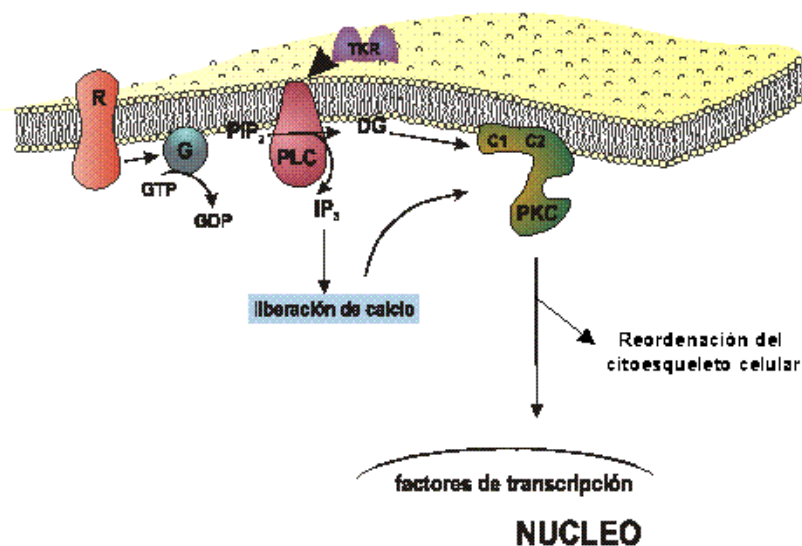


Figura I.16. Esquema de un mecanismo de señalización intracelular en el que participa la PKC. La activación de la PLC a través de receptores específicos de membrana estimulados por diversas señales extracelulares produce la hidrólisis del PIP₂ y la formación de los segundos mensajeros DAG e IP₃ que inducirán la activación de la PKC. El IP₃ promueve la liberación de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares. El DAG junto con el Ca²⁺ liberado producen la traslocación de la PKC a la membrana para su activación. La PKC activada es capaz de fosforilar a diferentes sustratos lo que permitirá la transmisión de la señal extracelular hasta la reordenación del citoesqueleto o hasta el núcleo donde se activaría la transcripción de determinados genes.

Existen otras vías de activación de la PKC, como las que implican la hidrólisis de la fosfatidilcolina por la fosfolipasa D (PLD) o la fosfolipasa A₂ (PLA₂). La PLD, activada por unos receptores específicos de la membrana plasmática, hidroliza fosfatidilcolina y produce ácido fosfatídico, el cual además de poder ser un activador directo de la PKC, puede ser convertido en DAG por una fosfomonoesterasa (Martín, 1988). La PLA₂ por su parte, actúa hidrolizando fosfatidilcolina y produciendo lisofosfatidilcolina y ácidos grasos libres, los cuales también están implicados en la regulación de la actividad de la PKC (Nishizuka, 1995).

Una vez activada, la PKC actúa fosforilando a otras proteínas en residuos de Ser o Thr en condiciones fisiológicas después de haber reconocido una secuencia sustrato (Woodget y col., 1987). Esta secuencia suele variar de unas proteínas a otras pero es común en ellas la aparición de residuos básicos de Lys y Arg tanto delante como detrás del sitio de fosforilación. De hecho, utilizando péptidos sintéticos se ha

podido determinar que la secuencia consenso de fosforilación por la PKC es RXXS/TXRX, donde S y T son los residuos de Ser o Thr fosforilables y X es cualquier aminoácido (Nishikawa y col., 1997).

Existen numerosos sustratos descritos para la PKC. La PKC es capaz de interaccionar con distintos canales iónicos, estimulando o inhibiendo su función (Sigel y Bauer, 1988). De hecho, en el sistema nervioso, la PKC influye sobre la excitabilidad de las membranas de las células nerviosas y promueve la liberación de neurotransmisores mediante la fosforilación de los canales iónicos.

Las MARCK son proteínas miristoladas ricas en Ala que están implicadas en diversos procesos celulares como la regulación del citoesqueleto (Hartwig y col., 1992; Myat y col., 1997), la secreción, la motilidad y la mitosis celular (Vergères y col., 1995). Estas proteínas están presentes en todas las células y son sustratos para todas las isoenzimas de la PKC, excepto para la PKC ζ (Überall y col., 1997). La asociación de las MARCKs y de la pleckstrina al citoesqueleto es un proceso dependiente de la PKC (Hartwig y col., 1992; Brunei y col., 1997; Myat y col., 1997). Además, tanto las MARCKs como otras proteínas relacionadas con ellas (proteínas MacMARCK) son sustratos de la PKC y precisan fosfatidilserina para interaccionar con la enzima. Cuando la PKC fosforila a MARCK en su extremo amino terminal se produce su traslocación desde el citosol a la membrana (Thelen y col., 1991).

Por otro lado, un estudio reciente ha propuesto que la función del dominio C2 de las isoenzimas de la PKC insensibles a Ca^{2+} puede ser la interacción con otras proteínas, ya que se demostró la intervención del dominio C2 de las PKC δ en la asociación de la enzima a la proteína GAP-43 (Dekker y Parker, 1997). La proteína GAP-43 es una GTPasa de 43kDa asociada al crecimiento que está presente en los sinaptosomas y parece modular la actividad de la fosfatidilinositol-4-fosfoquinasa (Akers y col., 1986; Chan y col., 1986; Benowitz y col., 1987; Tanaka y col., 1991).

Uno de los papeles más importantes en los que la PKC está implicada es en la regulación de la expresión de determinados genes. Se ha demostrado que la PKC incrementa la transcripción de genes específicos a nivel nuclear en muchos tipos

celulares. Dos de las rutas más conocidas de acción de la PKC a este nivel son la activación de la cascada de las MAP quinasas (MAPK) y la liberación de la proteína NF- κ B del complejo I- κ B/NF- κ B (Ghosh y Baltimore, 1990; Ueda y col., 1996; Schonwasser y col., 1998).

Las MAPK son una familia de serín/treonín-quinatas que al parecer están implicadas en las transiciones del ciclo celular y, por lo tanto, en la proliferación celular. La activación de la ruta de las MAPK parece iniciarse con los ésteres de forbol y la PKC parece estar implicada ya que los mutantes permanentemente activados de la PKC estimulan esta ruta y los inactivos la inhiben (Treisman, 1996; Marais y Marshall, 1996). A pesar de que el mecanismo completo no se conoce con exactitud, en esta ruta la proteína Ras activa a Raf-1 y entonces se activan las quinasas que fosforilan a la MAPK (MEK1 y MEK2) (Ueda y col., 1996), la cual una vez activada (fosforilada), fosforila proteínas como Jun o Elk-1 que inducen la transcripción génica a nivel nuclear (Cai y col., 1997; Schonwasser y col., 1998). No se sabe con certeza si la PKC actúa directamente sobre Raf-1. Si bien ciertas isoenzimas de la PKC activan la ruta de las MAPK independientemente de Raf-1, como la PKC ζ , se sabe que otras isoenzimas son activadoras de Raf-1, como la PKC α , la PKC θ (Schonwasser y col., 1998) o la PKC δ (Ueda y col., 1996).

La proteína NF- κ B es un mediador intracelular de la expresión génica (Lenardo y Baltimore, 1989), al cual se le puede unir I- κ B, dando lugar a un complejo inactivo. La PKC puede fosforilar a I- κ B (Ghosh y Baltimore, 1990), provocando así la disociación del complejo y dejando a NF- κ B libre para dirigirse al núcleo donde se enlaza al ADN activando la transcripción génica de forma específica (Baeuerle y col., 1988).

También se ha demostrado que el intercambiador de Na⁺/H⁺ puede ser activado por la ruta dependiente de PKC (Sardet y col., 1990). Este intercambiador es una fosfoglicoproteína de la membrana plasmática que regula el pH intracelular

La PKC interacciona con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), de forma que al fosforilar este receptor, disminuye la afinidad por el EGF (Lin y col., 1986).

La proteína pleckstrina es sustrato de la PKC en plaquetas y leucocitos. La PKC es capaz de fosforilar determinados residuos presentes en una zona adyacente a su dominio PH, lo cual conduce a la activación de la pleckstrina (Abrams y col., 1995).

Finalmente, existen otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto que pueden ser fosforiladas por la PKC y que requieren fosfatidilserina para la interacción con la enzima. Entre estas proteínas se encuentran la α , β y γ -adducinas y la proteína clon 72. Las adducinas son proteínas del citoesqueleto implicadas en la interacción entre la actina y la espectrina (Chapline y col., 1998; Fowler y col., 1998; Fowler y col., 1998b), mientras que la proteína clon 72 está relacionado con la remodelación del citoesqueleto y con el crecimiento celular (Chapline y col., 1996).

4. OBJETIVOS.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal profundizar en algunos aspectos sobre el mecanismo de regulación de la PKC. Como ya se ha comentado anteriormente, la PKC está implicada en numerosas rutas de transducción de señales y su actividad está modulada por diferentes factores, entre los que destacan las propiedades de la membrana y la presencia de determinados cofactores lipídicos y calcio. Todos estos factores pueden tener un mecanismo de acción distinto sobre las diferentes isoenzimas de las PKC, incluso entre los miembros de una misma familia. Resulta interesante poder aclarar por qué existen diferentes isoenzimas en una misma subfamilia y cuáles son las razones de su distinta regulación, expresión y localización.

De esta manera, en esta memoria se han utilizado tres isoenzimas de la PKC pertenecientes a la misma subfamilia de PKC clásicas, la PKC α , la PKC β II y la PKC γ . Una parte importante del estudio se ha centrado en caracterizar la estructura de los dominios C2 de estas isoenzimas, así como, en analizar el mecanismo de interacción de los mismos con diferentes efectores, como fosfolípidos y calcio. Como ya se ha comentado, el dominio C2 tiene una gran importancia en la regulación de la PKC ya que enlaza dos de los principales cofactores (calcio y fosfolípidos aniónicos)

necesarios tanto para la localización de la proteína en las membranas celulares como para su actividad catalítica.

Los objetivos principales propuestos en este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar las propiedades físicas de distintos modelos de membrana con diacilglicérol de diferente tipo, con cadenas saturadas e insaturadas, para así establecer una relación con su capacidad de activar a la PKC α .
2. Estudiar mediante espectroscopía de fluorescencia la estabilidad y afinidad de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ por Ca²⁺ y fosfolípidos.
3. Estudiar mediante calorimetría diferencial de barrido y calorimetría de titulación isotérmica la estabilidad y afinidad de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ por Ca²⁺ y fosfolípidos.
4. Estudiar mediante espectroscopía de IR uni- y bidimensional la estructura secundaria en disolución de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ (topología I), así como el efecto sobre dicha estructura de la unión de Ca²⁺ y de lípidos y su comportamiento cuando se produce la desnaturalización térmica.
5. Estudiar mediante espectroscopía de IR uni- y bidimensional la estructura secundaria en disolución de la PKC α completa, así como el efecto sobre dicha estructura del enlace de diferentes cofactores y su comportamiento cuando se produce la desnaturalización térmica.

Capítulo II

Técnicas y Métodos generales.

1. TÉCNICAS.

1.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica termodinámica que permite medir el cambio en la capacidad calorífica aparente (C_p) de un sistema particular en función continua de la temperatura. La capacidad calorífica presenta un máximo a la temperatura de transición entre diferentes estados o fases y la integral del área bajo la curva de transición se corresponde con el incremento de la entalpía de transición (ΔH):

$$\Delta H = \int_{T_i}^{T_f} C_p dT$$

donde T_i y T_f son las temperaturas inicial y final de la transición, respectivamente.

Con la calorimetría diferencial de barrido, mediante la representación de C_p en función de la temperatura (Figura II.1), se pueden obtener cinco parámetros importantes que proporcionan información sobre las propiedades termotrópicas de un sistema biológico en estudio. Estos parámetros son:

- a) ΔH , incremento en la entalpía de transición, característica de cada tipo de sistema.
- b) T_c , temperatura de transición, temperatura a la cual comienza a aparecer la transición de fase.
- c) T_m , temperatura a la cual la transición se ha completado al 50%.
- d) $\Delta T_{1/2}$, la anchura del pico de la transición a media altura, la cual proporciona información sobre la cooperatividad de la transición, es decir, del número de moléculas que sufren la transición de forma simultánea. Así, cuanto más estrecho es el pico (menor $\Delta T_{1/2}$), mayor cooperatividad presenta la transición de fase.
- e) ΔC_p , exceso de la capacidad calorífica del sistema, es la cantidad de calor por mol necesaria para elevar un grado la temperatura de la muestra.

1.1.1. Calorimetría diferencial de barrido de lípidos.

El estado físico-químico de los lípidos está íntimamente relacionado con la temperatura, de manera que el seguimiento de su capacidad calorífica muestra las transiciones de fase que se producen en el lípido como consecuencia del cambio de la temperatura. La transición cuantitativamente más importante de un sistema fosfolipídico que se puede observar por DSC es la que ocurre de la fase gel a la líquido-cristalina, la cual está asociada a un aumento en la libertad conformacional de las cadenas de ácidos grasos que componen el fosfolípido. Por debajo de la temperatura de transición, el sistema se encuentra en fase lamelar-gel y los fosfolípidos adoptan una estructura de bicapa, donde las cadenas de ácidos grasos están empaquetadas y ordenadas en una conformación de tipo todo-*trans*. Por encima de la temperatura de transición, el sistema se encuentra en fase líquido-cristalina y los fosfolípidos, a pesar de mantener una estructura de bicapa, presentan las cadenas de sus ácidos grasos mucho menos ordenadas. Este desorden es debido a la rotación alrededor de los enlaces C-C de las cadenas de ácidos grasos, dando lugar a la aparición de isómeros conformacionales tipo *gauche* (Chapman y Wallach, 1968; Luzzati, 1968; Lee, 1975; Schindler y Seelig, 1975; Jackson, 1976).

El termograma de la 1,2-dipalmitil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DPPC) se muestra en la Figura II.1A (López-García y col., 1994b). Este es uno de los modelos de membrana más estudiado. Se observan dos picos endotérmicos. El segundo es el pico de *transición principal* y se utiliza para determinar la temperatura a la que ocurre la transición de fase gel a líquido-cristalina (aproximadamente 41,5°C) y la entalpía de transición. A unos 5°C por debajo de esta transición principal, aparece una transición de menor entalpía denominada *pretransición*, por debajo de la cual, las cadenas de ácidos grasos están inclinadas con respecto a la perpendicular del plano de la bicapa y se encuentran en una configuración todo-*trans* (fase L_{β}). Al sobrepasar la pretransición, las cadenas hidrocarbурadas, a pesar de continuar en fase gel, se encuentran formando superficies onduladas (fase P_{β}). Esta fase P_{β} es un estado más desordenado que la fase L_{β} y se obtiene una ΔH menor que en la transición principal. Por encima de la transición principal, las cadenas acílicas del fosfolípido pasan a la forma del isómero *gauche*. La fase líquido-cristalina o fluida (L_{α}) se caracteriza por un rápido movimiento traslacional en el plano de la membrana y por un considerable desorden de las cadenas hidrocarbурadas (Luzzati, 1968).

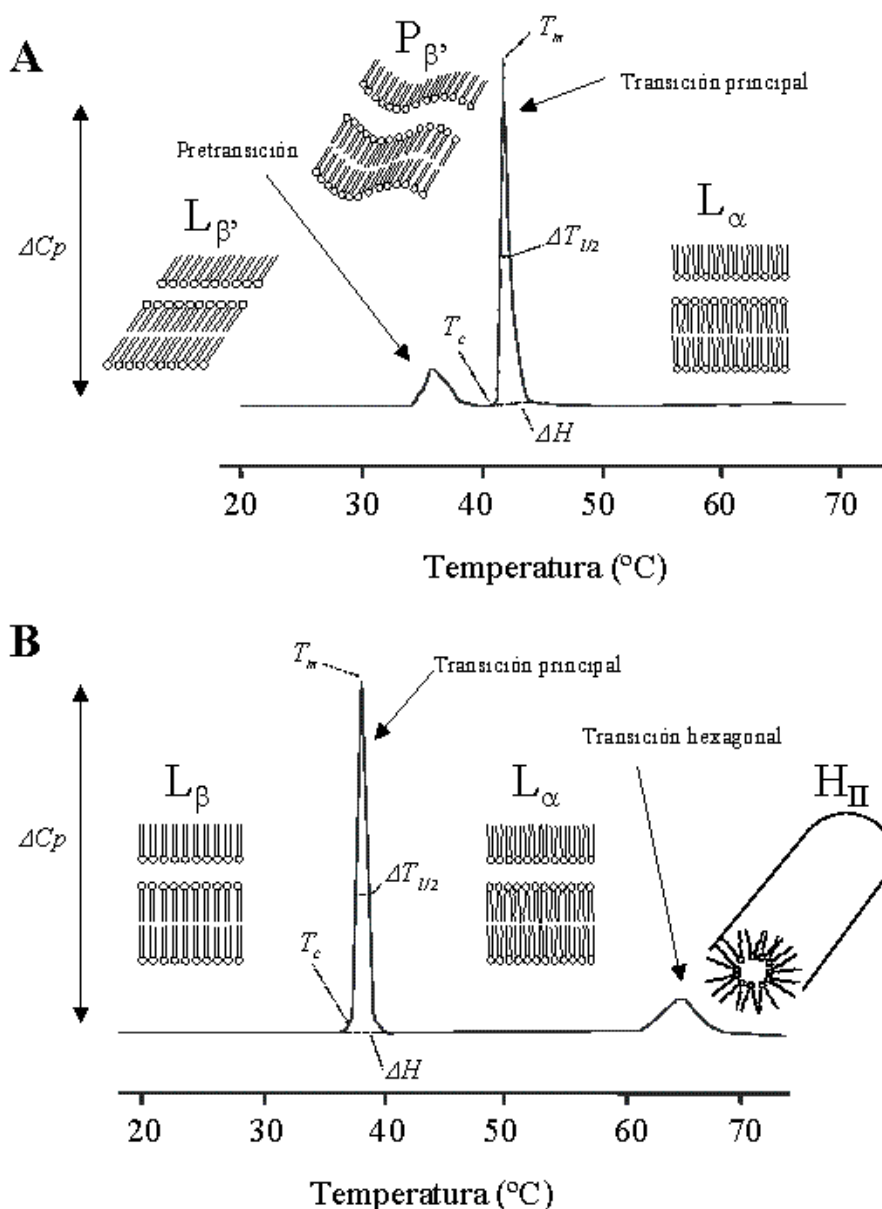


Figura 11.1. Termogramas de DSC de 1,2-dipalmitil-*sn*-glicero-3-fosfolina, DPPC, (A) y 1,2-dielaidil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, DEPE, (B). Se muestran los principales parámetros que se pueden obtener a partir de los termogramas: el incremento de la entalpia de transición (ΔH), la temperatura de transición (T_c), la temperatura de transición media (T_m), la anchura de la transición a media altura ($\Delta T_{1/2}$) y el exceso de la capacidad calorífica (ΔC_p). También se muestran los picos de la pretransición, la transición principal y la transición hexagonal, así como las distintas fases en que podemos encontrar a estos fosfolípidos. En el caso de DPPC, por debajo de la pretransición, los ácidos grasos de los fosfolípidos se encuentran inclinados y en configuración *todo-trans* (fase $L_{\beta'}$), mientras que al superar dicha pretransición forman superficies onduladas (fase $P_{\beta'}$). Por encima de la transición principal encontramos la fase líquido-cristalina o fluida (fase L_{α}), donde las cadenas acílicas aparecen en forma del isómero *gauche*. Por otro lado, para DEPE, por debajo de la transición principal, los ácidos grasos de los fosfolípidos se encuentran perpendiculares al plano de la bicapa (fase L_{β}). Por encima de la transición principal encontramos la fase líquido-cristalina o fluida (fase L_{α}), al igual que en el anterior caso con DPPC. Finalmente, en la fase hexagonal invertida (fase H_{II}), los lípidos se disponen en cilindros empaquetados hexagonalmente.

Otro grupo de fosfolípidos muy estudiado son las fosfatidiletanolaminas (PE) que, junto con las fosfatidilcolinas, son los fosfolípidos más frecuentes en membranas de mamíferos. Algunas PE poseen, además de la transición principal de la fase gel a la fase líquido-cristalina, otra transición a mayor temperatura desde la fase líquido-cristalina a la fase hexagonal invertida (H_{II}). En esta fase hexagonal invertida H_{II} los lípidos se disponen en cilindros empaquetados hexagonalmente, donde las cabezas polares de las moléculas fosfolípídicas se encuentran orientadas hacia un estrecho canal acuoso situado en el interior del cilindro. El termograma obtenido de la 1,2-dielaidil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (DEPE) se muestra en la Figura II.1B (de Kruijff y col., 1983). En el mismo, se puede observar la transición de fase hexagonal H_{II} a 63°C. La baja ΔH de esta transición hexagonal se debe a que lo único que ocurre es un cambio en la organización de los fosfolípidos, manteniéndose las cadenas acílicas en estado fluido en ambas fases. Este tipo de transición ha sido observada para gran cantidad de PE naturales y sintéticas (de Kruijff y col., 1985; Cullis y col., 1985).

1.1.2. Calorimetría diferencial de barrido de proteínas.

La calorimetría diferencial de barrido es la técnica experimental más directa para resolver los parámetros termodinámicos de las transiciones de conformación de las macromoléculas biológicas. Esta técnica suministra información sobre el mecanismo que gobierna el equilibrio conformacional entre, por ejemplo, las formas nativa y desnaturalizada de una proteína mediante la medida de la dependencia de la capacidad calorífica con respecto a la temperatura.

La capacidad calorífica, $C_p(T)$, obtenida en un experimento de DSC proporciona información sobre el estado conformacional de la proteína en el intervalo de temperatura estudiado. De esta forma, la capacidad calorífica específica de una proteína nativa es significativamente menor que la de una proteína desnaturalizada (Jelesarov y col. 1999).

Cuando una proteína es calentada, la capacidad calorífica específica, $C_p(T)$, sigue una curva con un pico de transición si la desnaturalización proteica es cooperativa y reversible. La Figura II.2 muestra un termograma típico. La proteína se

desnaturaliza en el intervalo de temperatura T_1 a T_2 , con una temperatura de transición media T_m .

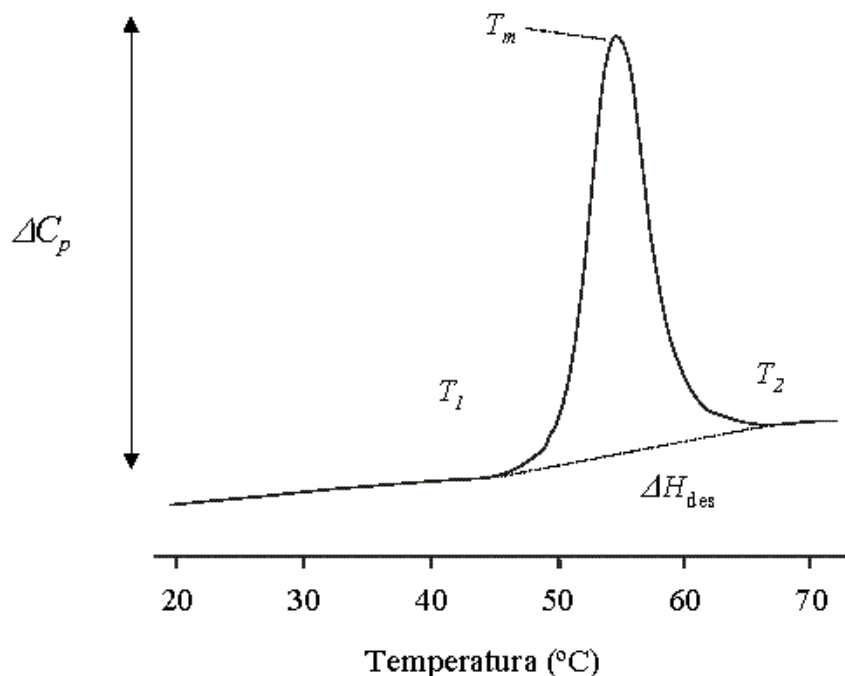


Figura II.2. Termograma modelo obtenido por DSC para una proteína. Se muestra el pico de transición y los parámetros termodinámicos que se pueden obtener de los termogramas: el exceso de la capacidad calorífica (ΔC_p), las temperaturas de inicio y finalización de la transición (T_1 y T_2 , respectivamente), la temperatura de transición media (T_m) y el exceso de entalpía de la desnaturalización térmica (ΔH_{des}).

De nuevo, el exceso de entalpía de la desnaturalización térmica, ΔH_{des} , corresponde con el área del pico de la transición y se define como

$$\Delta H_{des} = \int_{T_1}^{T_2} C_p \, dT$$

donde T_1 y T_2 son las temperaturas inicial y final de la transición, respectivamente.

A su vez, el exceso de entropía de la desnaturalización se define como:

$$\Delta S_{des} = \int_{T_1}^{T_2} \frac{C_p}{T} \, dT$$

La calorimetría diferencial de barrido se puede utilizar para estudiar los procesos de interacción entre moléculas. Si un ligando L se une a una proteína M en estado nativo con alta afinidad, la capacidad calorífica del complejo resultante ML diferirá de la de M y L aislados (Figura II.3). Los perfiles obtenidos de L , M y ML pueden tener diferentes formas. De hecho, pueden ocurrir importantes deformaciones de los termogramas de proteínas en estado asociado (Takahashi y col., 1985; Lin y col., 1994; Conejero-Lara y col., 1996). En estos casos, una desconvolución cuidadosa de los termogramas obtenidos puede arrojar luz sobre las fuerzas termodinámicas que conducen la reacción de interacción y pueden proporcionar información estructural de las especies que interaccionan y sobre la mecánica de la interacción (Davis y col., 1995; Filimonov y col., 1996). De hecho, se ha aplicado el análisis de la desconvolución de ciertos barridos de DSC al estudio termodinámico de la unión de pequeños ligandos similares al hierro a transferrinas (Lin y col., 1994), al estudio de la unión de sulfato a la fosfoglicerato quinasa de levaduras (Hu y col., 1989) y de biotina a estreptavidina (González y col., 1997).

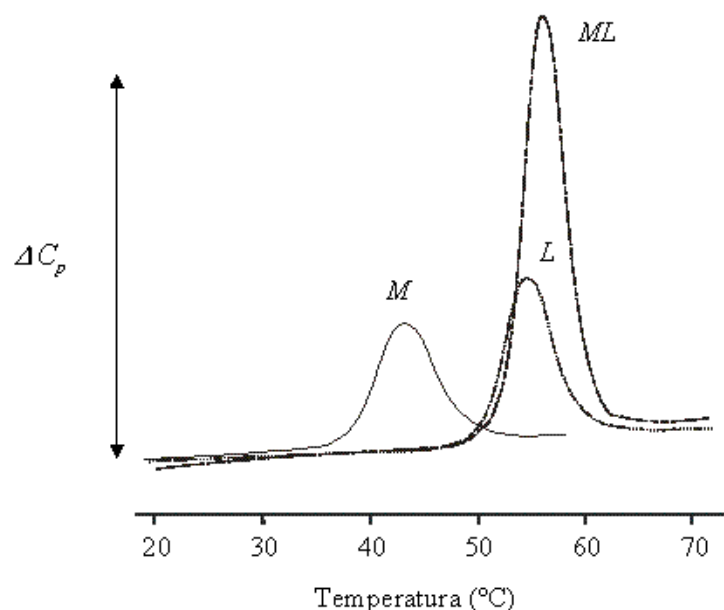


Figura II.3. Termogramas simulados de los perfiles de una proteína (M), un ligando (L) y el complejo unido (ML). Se muestra el caso en que los perfiles de la proteína (línea continua), el ligando (línea punteada) y el complejo unido (línea rayada) son diferentes.

De esta forma, la calorimetría diferencial de barrido puede utilizarse con éxito como alternativa para medir afinidades de unión no accesibles para otras técnicas de equilibrio no calorimétricas.

1.2. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es el método más directo para medir el cambio de calor que se produce en la formación de un complejo de interacción a una temperatura constante. Ya que el experimento de titulación se lleva a cabo generalmente inyectando un ligando L en una disolución de una macromolécula M (aunque también puede realizarse a la inversa), la constante de asociación, K_a y la estequiometría del proceso, n , se obtienen a partir de los resultados experimentales.

Incluso a partir de experimentos de ITC realizados a diferentes temperaturas se podría obtener ΔC_p según la ecuación

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta H)}{dT} = T \frac{d(\Delta S)}{dT}$$

El ligando L se inyecta con una jeringa de precisión de forma automatizada mediante un motor controlado por el ordenador del equipo. Después de la adición de una pequeña alícuota de ligando, el calor liberado o absorbido en la celda de la muestra es medido respecto a una celda de referencia rellena con tampón. El cambio calorífico es expresado en forma de la capacidad eléctrica ($\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$) necesaria para mantener una diferencia de temperatura pequeña y constante entre la celda de referencia y la de la muestra, las cuales se encuentran en el interior de una camisa adiabática. El contenido de la celda de la muestra es sometido a agitación para conseguir un mezclado rápido de los reactivos. La cantidad de macromolécula y ligando necesarias para un experimento depende de la magnitud del cambio de calor derivado de la unión.

La Figura II.4A muestra los datos crudos obtenidos de un experimento de ITC. Cada pico corresponde al calor liberado debido a la adición de una alícuota de ligando. La integración de la señal eléctrica respecto al tiempo proporciona el cambio calorífico aparente, $\Delta q_{i,\text{ap}}$, entre las inyecciones $i-1$ e i , y se corresponde con el área bajo el pico i ,

$$\Delta q_{i,\text{ap}} = q_i - q_{i-1}$$

Si K_a es grande y la relación molar del L respecto a M al principio de la titulación es bajo, entonces todo el L estará unido y las áreas de los picos serán similares. Conforme la fracción de sitios saturados aumenta, los calores observados descienden gradualmente. Finalmente, todos los sitios se encuentran saturados y los pequeños calores detectados se deben al calor de dilución de L en el tampón y a otros efectos no específicos.

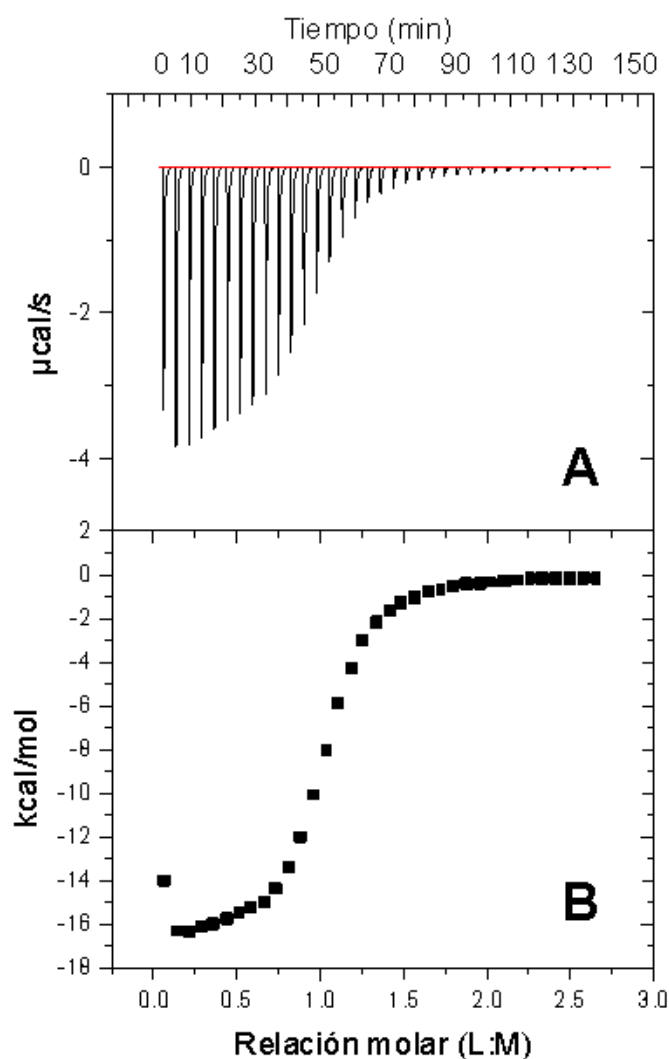


Figura II.4. Datos obtenidos de un experimento de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Se muestran los datos crudos de la unión de ARN a la proteína ARNasa A, los cuales representan los calores liberados o absorbidos en cada inyección (A) y estos mismos datos una vez integrados en función de las concentraciones de ligando y macromolécula (B). Sobre estos últimos se realiza el ajuste a los modelos teóricos utilizando el programa Origin 5.0 (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.).

Los datos se suelen representar de *modo diferencial*, mostrando el calor total normalizado frente a la relación molar de la concentración entre L y M . Esto da lugar a la típica curva de saturación sigmoideal (Figura II.4B). La variación de calor por mol, ΔH_{ap} , así como el número de sitios de unión, n , se pueden obtener a partir de esta representación. Ambos parámetros, n y ΔH_{ap} , están estrechamente relacionados y el éxito en la desconvolución de la gráfica de ITC depende de información adicional independiente sobre el número de sitios de unión de M .

El análisis de los datos se realiza en un programa informático (Origin, MicroCal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) que permite ajustar los datos experimentales a diferentes modelos de unión teóricos, como el modelo de unión a un solo tipo de sitio, el modelo de unión a dos tipos de sitios o el modelo de unión de tipo secuencial.

Para obtener constantes de unión fiables, las concentraciones de las especies deben encontrarse en un rango adecuado. Si la concentración de los sitios de unión es mucho mayor que $1/K_a$, todo el L añadido estará unido hasta la saturación, y la isoterma de unión tendrá una forma rectangular con una pendiente muy acusada en lugar de la observada en la Figura II.4B. En el caso opuesto, cuando la concentración de sitios de unión es mucho menor que $1/K_a$, la isoterma de unión tiene una pendiente muy baja y la saturación total es difícil de conseguir. Para conseguir valores de K_a precisos, la concentración de los sitios de unión no debe ser mucho mayor que $1/K_a$.

Para determinar la concentración de macromolécula M necesaria en cada experimento se utiliza como orientación el parámetro c . Este valor adimensional c se obtiene multiplicando la constante de asociación estimada (K_a) por la concentración total de sitios de unión supuesta (Wiseman y col., 1989). Utilizando una concentración de M entre 10-100 veces c , se pueden obtener buenos valores de K_a . No obstante, en ocasiones las concentraciones óptimas no son posibles. Para casos donde la unión es de alta afinidad (K_a muy alta), las concentraciones recomendables mediante el parámetro c son muy pequeñas para producir cambios de calor apreciables. Por ello, aunque se utilicen los instrumentos más sensibles, no se pueden medir con precisión valores de K_a mayores de 10^9 M^{-1} . En estos casos, se puede utilizar la calorimetría diferencial de barrido (DSC) como técnica alternativa de

medida. En cambio, cuando la unión es de baja afinidad (K_a es muy baja), las concentraciones de M necesarias recomendables, según el valor c , son tan altas que la agregación de las macromoléculas puede enmascarar la reacción de unión.

Los cambios en la entalpía obtenidos mediante ITC son reflejo de una propiedad global del sistema completo. Es el calor total liberado o absorbido en la celda con cada inyección realizada. El calor total contiene contribuciones de efectos no específicos, como el calor de dilución de L en el tampón, el calor causado por pequeños desajustes de temperatura entre la solución en la celda de medida y la punta de la jeringa de inyección, o el calor causado por el efecto de mezclar tampones de composición química ligeramente diferente. Algunos de estos calores inespecíficos (como el calor de dilución de L en el tampón) deben tenerse en cuenta a la hora de hacer los ajustes.

La entropía de asociación puede ser calculada mediante los valores medidos de ΔG , ΔH y ΔC_p de acuerdo con las leyes de la termodinámica. El cambio de entropía de un complejo en relación a las moléculas aisladas es debido principalmente a los efectos de hidratación, ya que la entropía de hidratación de los grupos polares y apolares es grande y hay una reducción importante de la superficie accesible de agua en la unión. Por ello, cuando se forma un complejo, la entropía total suele ser grande y generalmente positiva. De cualquier manera, en ocasiones ocurre una ordenación del agua en la interfase del complejo, lo cual contribuye desfavorablemente a ΔS , pero favorablemente a ΔH (Holdgate y col., 1997). Otra contribución importante y desfavorable para la variación de entropía se debe a la reducción de la movilidad de las cadenas laterales de los aminoácidos en el sitio de unión. Obviamente, una variación de entropía negativa puede tener diferentes orígenes y, lo que es más importante, no necesariamente indica que la hidratación de la interfase permanece invariable o aumenta con respecto a las moléculas libres. En el otro lado, una variación de entropía positiva es indicativa de que las moléculas de agua han sido expulsadas de la interfase del complejo.

El aspecto más destacable de esta técnica es su simplicidad, pues permite obtener el conjunto completo de parámetros termodinámicos a partir de unos pocos experimentos a diferentes temperaturas. No obstante, la dificultad se encuentra en el

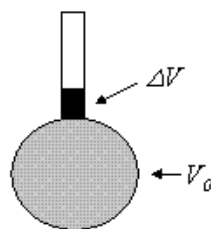
hecho de que el cambio calorífico observado es una propiedad global como ya hemos comentado. Sólo en los casos donde el mecanismo de unión se puede definir como una transición de dos estados entre la molécula libre y el complejo unido y donde no hay cambio en el estado de protonación de L y/o M ni cambio en el estado de hidratación de la interfase, ΔH obtenida será igual a la entalpía de unión “real” atribuible a enlaces no covalentes en el complejo.

Aunque ITC es la técnica más adecuada para definir los parámetros termodinámicos de una reacción de unión entre biomoléculas, la combinación de ITC con DSC ofrece una descripción más completa de la termodinámica del sistema de asociación, ya que son los únicos métodos para la medida directa de ΔH .

1.2.1. Ecuaciones utilizadas para el ajuste de los datos de ITC.

1.2.1.1. Consideraciones generales.

Se asume que la macromolécula M está en la celda de la muestra a una concentración inicial de M_i^0 antes de la primera inyección y que el ligando L está a una concentración inicial nula en la celda. El volumen de trabajo (área rayada) de la celda es V_0 , el tamaño de la inyección i es ΔV_i y el líquido total que ha sido inyectado en cualquier momento del experimento, ΔV , es simplemente la suma del producto de ΔV_i por todas las inyecciones realizadas.



Al principio del experimento, tanto la celda como el tubo largo de comunicación están rellenos de M , pero sólo la cantidad contenida en V_0 es sensible para cambios calorimétricos. Debido a este llenado completo de la celda, cada inyección impulsa líquido fuera del volumen de trabajo V_0 hacia el tubo alargado (ΔV). Así, la concentración de M cambia ligeramente con cada inyección, ya que el número total de moles de M al principio del experimento es más tarde repartido en un volumen mayor ($V_0 + \Delta V$).

Ya que la concentración media de M en ΔV es la media entre M_i^0 y la concentración correspondiente M_i en V_0 , entonces la ley de la conservación de la masa exige que

$$M_i^0 V_0 = M_i V_0 + \frac{1}{2} (M_i + M_i^0) \Delta V \quad (1)$$

Y así,

$$M_i = M_i^0 \left[\frac{1 - \frac{\Delta V}{2V_0}}{1 + \frac{\Delta V}{2V_0}} \right] \quad (2)$$

Utilizando un razonamiento similar, es fácil mostrar que la concentración actual de ligando en V_0 , X_i , está relacionada con la hipotética concentración X_i^0 (asumiendo que todo el ligando inyectado permanece en V_0) de la siguiente forma

$$X_i^0 V_0 = X_i V_0 + \frac{1}{2} X_i^0 \Delta V \quad (3)$$

$$X_i = X_i^0 \left[1 - \frac{\Delta V}{2V_0} \right] \quad (4)$$

Las expresiones anteriores para M_i y X_i se utilizan en el programa Origin (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) para corregir los efectos del desplazamiento de volumen que ocurren con cada inyección.

1.2.1.2. Modelo de unión a un tipo único de sitios idénticos.

En las siguientes ecuaciones,

M es la macromolécula.

L es el ligando.

K es la constante de unión.

n es el número de sitios.

V_0 es el volumen activo de la celda.

M_t y $[M]$ son las concentraciones total y libre de M en V_0

X_t y $[X]$ son las concentraciones total y libre de L .

Θ es la fracción de sitios ocupados por L .

La constante de unión, K , queda definida como

$$K = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[X]} \quad (5)$$

Por otro lado, la concentración total de ligando, X_t , se define como

$$X_t = [X] + n \Theta M_t \quad (6)$$

Combinando (5) y (6) obtenemos

$$\Theta^2 - \Theta \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{l}{nKM_t} \right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \quad (7)$$

El contenido total de calor Q de la disolución en V_0 (suponiendo cero las procedentes de las especies no ligadas) a una fracción de saturación Θ es

$$Q = n \Theta M_t \Delta H V_0 \quad (8)$$

donde ΔH es el calor molar de la unión del ligando.

Resolviendo la ecuación cuadrática (7) para obtener Θ , se puede sustituir ese valor en (8), obteniendo así

$$Q = \frac{nM_t \Delta H V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{l}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{l}{nKM_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}} \right] \quad (9)$$

El valor de Q puede ser calculado (para cualquier valor asignado de n , K y ΔH) al final de la inyección i y se denomina $Q(i)$. El parámetro de interés para

comparar es el cambio en el contenido de calor desde la finalización de la inyección $i-1$ hasta la finalización de la inyección i . La expresión de Q en la ecuación (9) sólo se aplica al líquido contenido en V_0 . Así, después de la finalización de una inyección, es obvio que se debe realizar una corrección en el volumen, teniendo en cuenta el volumen desplazado ($\Delta V_i =$ el volumen de inyección) ya que parte del líquido en V_0 después de la inyección $i-1$ no va a estar más en V_0 después de la inyección i , a pesar de que contribuya el efecto de calor antes de salir de V_0 (asumiendo que la cinética de la reacción y el mezclado son rápidos). El líquido del volumen desplazado contribuye en un 50% como mucho al efecto del calor en relación con un volumen equivalente que permaneciera en V_0^* . La expresión correcta entonces para el calor liberado, $\Delta Q(i)$, de la inyección i será

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] \cdot Q(i-1)$$

*El primer elemento de volumen infinitesimal de la inyección i no contribuye al efecto de calor, ya que el sistema se ha equilibrado anteriormente a las concentraciones existentes después de la inyección $i-1$. El último elemento del volumen de una inyección contribuye a los efectos del calor de igual forma que el líquido remanente en V_0 , a que su concentración es equivalente a la de V_0 después de la inyección i . Asumiendo linealidad en el pequeño incremento de volumen ΔV_i , entonces el líquido en el volumen desplazado es sólo la mitad de efectivo en producir calor respecto al líquido en V_0 .

El proceso de ajuste de los datos experimentales implica:

- Realizar suposiciones iniciales sobre n , K y ΔH (que pueden realizarse mediante el programa por Origin 5.0 de forma lo suficientemente precisa).
- Calcular $\Delta Q(i)$ para cada inyección y comparación de estos valores con el calor medido en la correspondiente inyección experimental.
- Mejorar los valores iniciales de n , K y ΔH mediante métodos estándar de tipo Marquardt.
- Iteración del proceso anterior hasta no encontrar mejoras significativas en el ajuste.

1.2.1.3. Modelo de unión a dos tipos de sitios independientes.

Utilizando la misma definición de símbolos que en el anterior caso, para el tipo 1 y el tipo 2 de sitios tenemos que las constantes de unión, K_1 y K_2 , y la concentración total de ligando, X_t , son

$$K_1 = \frac{\Theta_1}{(1-\Theta_1)[X]} \quad K_2 = \frac{\Theta_2}{(1-\Theta_2)[X]} \quad (11)$$

$$X_t = [X] + M_t(n_1\Theta_1 + n_2\Theta_2) \quad (12)$$

Despejando Θ_1 y Θ_2 en las ecuaciones (11) y sustituyendo en (12), se obtiene

$$X_t = [X] + \frac{n_1 M_t [X] K_1}{1 + [X] K_1} + \frac{n_2 M_t [X] K_2}{1 + [X] K_2} \quad (13)$$

Eliminado los quebrados y agrupando términos, se obtiene una ecuación cúbica del tipo

$$[X]^3 + p[X]^2 + q[X] + r = 0 \quad (14)$$

donde

$$p = \frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2} + (n_1 + n_2)M_t - X_t$$

$$q = \left(\frac{n_1}{K_2} + \frac{n_2}{K_1} \right) M_t - \left(\frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2} \right) X_t + \frac{1}{K_1 K_2} \quad (15)$$

$$r = \frac{-X_t}{K_1 K_2}$$

Se puede despejar $[X]$ en las ecuaciones (14) y (15) de forma matemática o bien, como hace el programa Origin 5.0 (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.), de forma numérica utilizando el método de Newton si los parámetros n_1 , n_2 , K_1 y K_2 son definidos. Entonces, tanto Θ_1 como Θ_2 se pueden obtener de la ecuación (11).

Como se aclaró antes, el contenido de calor después de una inyección i es igual a

$$Q = M_i V_0 (n_1 \Theta_1 \Delta H_1 + n_2 \Theta_2 \Delta H_2) \quad (16)$$

Después de una corrección similar a la realizada en el anterior caso para el volumen desplazado, el efecto del calor calculado para la inyección i es

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (17)$$

Que puede ser utilizado en el algoritmo de Marquardt para obtener los mejores valores para los seis parámetros del ajuste.

1.2.1.4. Modelo de unión a sitios secuenciales.

Para la unión según un modelo secuencial, las constantes de unión K_1 , K_2, \dots, K_n deben definirse en relación al proceso de saturación, de forma que

$$K_1 = \frac{[MX]}{[M][X]} \quad K_2 = \frac{[MX_2]}{[MX][X]} \quad \dots \quad K_n = \frac{[MX_n]}{[MX_{n-1}][X]} \quad (18)$$

En el modelo secuencial, no hay distinción en cuanto a qué sitios están saturados, sino sólo si el número total de sitios está saturado. Si los sitios son idénticos, hay entonces una degeneración estadística asociada a la saturación secuencial, ya que el primer ligando en unirse tiene más sitios vacíos del mismo tipo para elegir que los que tiene el segundo ligando y así sucesivamente. Para sitios idénticos que interaccionan, podemos distinguir entre las constantes de unión

fenomenológicas K_i , definidas en la ecuación (18), y las constantes de unión intrínsecas K_i^0 donde el efecto de estas degeneraciones ha sido eliminado. La relación entre estos dos tipos de constantes viene dada por

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} K_i^0 \quad (19)$$

Todos los cálculos definidos a continuación, así como los parámetros obtenidos del ajuste, se encuentran definidos en términos de K_i . Se pueden obtener los valores de K_i^0 utilizando la ecuación (19).

Ya que las concentraciones de todas las especies ligadas $[ML_i]$ pueden ser expresadas en términos de concentración de las especies no ligadas, $[M]$, entonces la fracción de la macromolécula total con i ligandos unidos, F_i , es simple

$$\begin{aligned} F_0 &= \frac{1}{P} \\ F_1 &= \frac{K_1[X]}{P} \\ F_2 &= \frac{K_1 K_2 [X]^2}{P} \\ &\vdots \\ F_n &= \frac{K_1 K_2 \dots K_n [X]^n}{P} \end{aligned} \quad (20)$$

donde

$$P = 1 + K_1[X] + K_1 K_2 [X]^2 + \dots + K_1 K_2 \dots K_n [X]^n \quad (21)$$

$$X_i = [X] + M_i \sum_{i=1}^n i F_i$$

Una vez que n y los parámetros de ajuste K_1 a K_n están definidos, entonces las ecuaciones (20) y (21) pueden resolverse mediante métodos numéricos, como el método de la bisección que utiliza el programa Origin (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.).

Una vez conocido $[X]$, todos los F_i se pueden calcular a partir de la ecuación (20) y el contenido de calor después de la inyección i queda determinado como

$$Q = M_i V_0 (F_1 \Delta H_1 + F_2 [\Delta H_1 + \Delta H_2] + \dots + F_n [\Delta H_1 + \Delta H_2 + \dots + \Delta H_n]) \quad (22)$$

Y como antes,

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_1}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1) \quad (23)$$

Esta ecuación es utilizada en la rutina de minimización de Marquardt.

1.3. Resonancia magnética nuclear (RMN).

En los últimos años, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se ha convertido en un importante método de estudio de la estructura, interacción y dinámica de macromoléculas naturales y sintéticas. En particular, las técnicas de RMN multidimensional han conseguido importantes aproximaciones para la resolución de la estructura de proteínas. Algunas de las técnicas de RMN (en concreto la RMN de ^{31}P) se han utilizado desde hace mucho tiempo para el estudio del polimorfismo lipídico, pues permiten determinar cualitativamente las fases lipídicas más importantes dentro de un sistema particular en estudio, pudiendo ser aplicadas tanto a membranas modelo como a membranas biológicas.

La resonancia magnética nuclear permite estudiar la estructura molecular por medio de la interacción de una radiación electromagnética (radiofrecuencias 10^6 - 10^{10} Hz) con un grupo de núcleos de la muestra colocados en un campo magnético.

Esta técnica solamente puede aplicarse a núcleos que poseen momento magnético (^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{31}P , etc). Cuando estos núcleos se someten a un campo magnético externo (B_0), su momento magnético adquiere una orientación paralela o antiparalela respecto a dicho campo para alcanzar el estado de mínima energía. Es posible hacer que el núcleo pase de un estado a otro aplicando otro

campo magnético (B_1) perpendicular al primero y con un determinado valor de frecuencia. La posterior emisión de energía debida a la relajación del núcleo es lo que se detecta en RMN y se denomina *frecuencia de resonancia*.

Para un determinado núcleo, el valor de dicha frecuencia depende del entorno molecular que lo rodea, pues los campos magnéticos producidos por los núcleos cercanos modifican el valor de B_0 . Cuando una molécula se somete a un campo magnético externo, los electrones de cada átomo producen pequeños campos magnéticos inducidos que se oponen al campo aplicado y que son proporcionales a él. Así, un núcleo experimentará un campo magnético efectivo que será el resultado del campo aplicado y de los campos inducidos por los átomos adyacentes a la molécula. De esta forma, se dice que los campos inducidos apantallan al núcleo con respecto al campo magnético aplicado.

El valor de la frecuencia de resonancia se denomina desplazamiento químico (δ) y se expresa en partes por millón (ppm):

$$\delta = \frac{\nu_m - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \times 10^6 \text{ (ppm)}$$

donde ν_m es la frecuencia de la muestra problema y ν_{ref} la de la muestra de referencia.

El hecho de utilizar una muestra de referencia presenta una gran ventaja, ya que los valores obtenidos son adimensionales e independientes del campo magnético externo B_0 o de la radiofrecuencia empleados, de manera que se pueden comparar los espectros obtenidos en distintos aparatos de RMN.

Otro parámetro importante en la espectroscopia de RMN es lo que se conoce como *tiempo de relajación*. Se denomina relajación al proceso por el cual los núcleos que han absorbido energía de la radiación para adoptar una orientación que supone un “estado excitado”, vuelven a la orientación original.

Las moléculas de muestras en disolución experimentan diversos tipos de movimientos (traslación, rotación y vibración), los cuales suelen ser más rápidos que la escala de tiempo que los aparatos de RMN pueden detectar. Entonces, las señales de los espectros recogidos se corresponden con los promedios de todas las posiciones, conformaciones y longitudes de enlace posibles que se producen en la molécula, de forma que aparecen bandas de resonancias únicas y bien definidas por un valor determinado de δ .

Sin embargo, cuando se analizan muestras sólidas o cuasi-sólidas, todos estos movimientos de las moléculas están bloqueados o retardados, de forma que se producen distintos valores de δ y, por lo tanto, en los espectros se recogen bandas mucho más anchas y con menor definición. En este caso, se habla de anisotropía de desplazamiento químico ($\Delta\sigma$).

1.3.1. Resonancia magnética nuclear de ^{31}P .

La espectroscopía de RMN de ^{31}P es una técnica ampliamente utilizada para determinar cualitativamente las distintas fases o estructuras presentes en diferentes mezclas lipídicas. La forma de los espectros de RMN de ^{31}P es muy característica de cada una de las diferentes fases lipídicas (la fase lamelar, la fase hexagonal invertida y la fase isotrópica).

De esta forma, cuando los lípidos adoptan una estructura de bicapa (fase lamelar), la señal obtenida es asimétrica (Figura II.5A). Se caracteriza por presentar un hombro en la zona de bajo campo, un pico a alto campo y una anisotropía de desplazamiento químico de aproximadamente 40-50 ppm. El pico corresponde a aquellos lípidos cuyos ejes longitudinales presentan una orientación perpendicular al campo magnético, mientras que el hombro corresponde a aquellos lípidos cuyos ejes poseen una orientación paralela al campo. La asimetría del perfil se debe a que es mayor la probabilidad de encontrar lípidos con sus ejes longitudinales perpendiculares al campo.

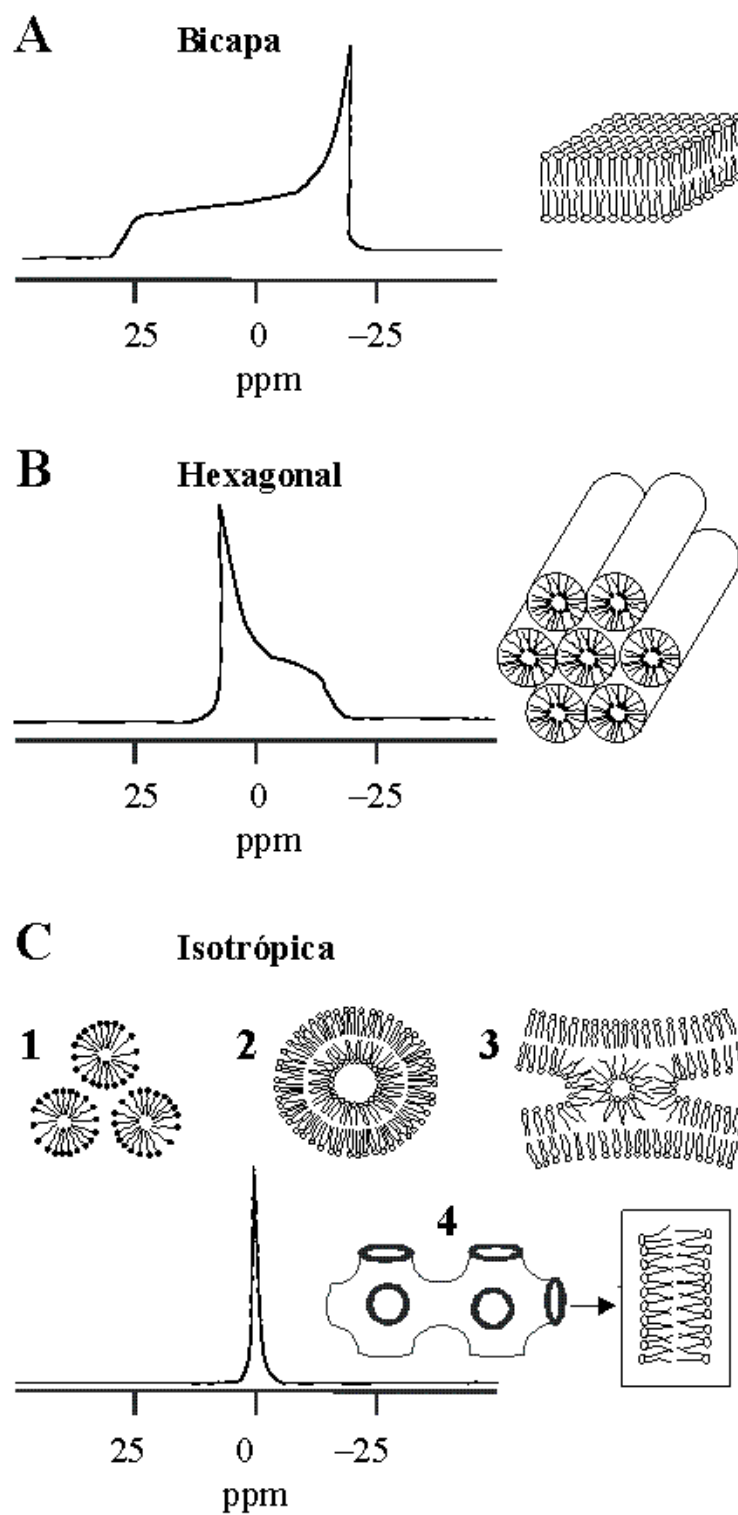


Figura II.5. Representación esquemática de las fases lipídicas y los espectros de ^{31}P -RMN correspondientes. Fase de bicapa (A), fase hexagonal H_{II} (B) y fase isotrópica debida a micelas (C1), vesículas unilamelares (C2), micelas invertidas (C3) y fases cúbicas (C4).

Otra estructura cuantitativamente importante es la fase hexagonal invertida (H_{II}). En este caso, los lípidos se disponen en estructuras cilíndricas dentro de las cuales, la probabilidad de encontrar lípidos cuyos ejes longitudinales se presenten perpendiculares al campo es menor (de Kruijff y col., 1985). Esto da lugar a un espectro con perfil invertido respecto al anterior (Figura II.5B), es decir, con un hombro a alto campo y un pico a bajo campo. Además, la difusión de lípidos alrededor del cilindro genera un movimiento adicional, lo cual lleva a una disminución de la anisotropía de desplazamiento químico que se observa en el estrechamiento del espectro (Seelig, 1978; Cullis y de Kruijff, 1979).

Finalmente, en aquellos sistemas lipídicos donde la reorientación molecular se produce en todas las direcciones posibles (movimiento isotrópico), el promedio de todos los movimientos da lugar a una única resonancia estrecha y centrada en 0 ppm (Figura II.5C). Esto sucede en el caso de lípidos que forman micelas normales o invertidas (C1 y C3), en vesículas unilamelares pequeñas (C2), y en estructuras con fases cúbicas (C4).

1.4. Espectroscopía de infrarrojo.

La espectroscopía de infrarrojo es una técnica biofísica de baja resolución que, a pesar de no proporcionar una información estructural detallada, permite avanzar en el estudio estructural de las moléculas biológicas. Esta técnica se basa en los cambios en la energía vibracional de los enlaces químicos debido a la absorción de la radiación del infrarrojo medio del espectro electromagnético (de 400 a 4000 cm^{-1}).

Las vibraciones características de átomos unidos de forma covalente pueden clasificarse en dos tipos principales, las *vibraciones de tensión*, que se deben a cambios en la distancia o longitud de los enlaces, y las *vibraciones de deformación*, que corresponden a cambios en los ángulos de enlace (figura II. 6).

Debido a los diferentes modos vibracionales de los átomos, la mayoría de los espectros de infrarrojo de los sistemas biológicos, son bastante complicados. Ciertos

grupos de átomos originan bandas vibracionales cerca o en la misma frecuencia, independientemente de la molécula a la que pertenezcan, constituyendo lo que se conoce como “frecuencias características de grupo”.

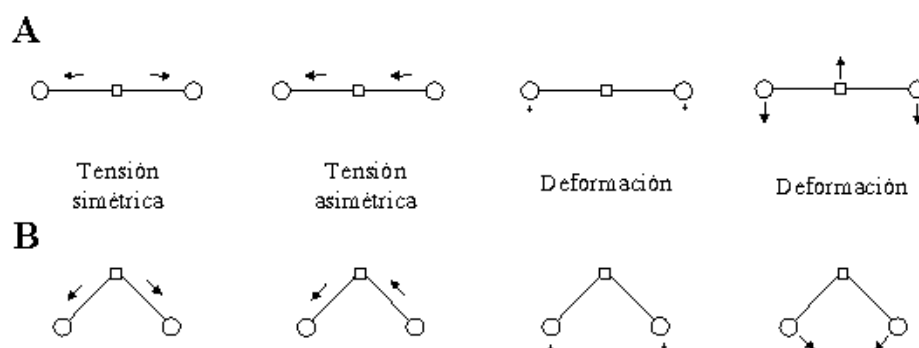


Figura II.6. Esquema con los tipos de vibraciones normales en una molécula triatómica lineal (A) y no lineal (B). Los desplazamientos atómicos están representados por flechas (en el plano) y por los símbolos - y + (fuera del plano). Tomado de Arrondo y col. (1993).

La frecuencia de vibración de los átomos y/o los grupos químicos puede verse afectada por su entorno molecular, mediante factores intra- o intermoleculares. Entre los factores intramoleculares destacan la simetría, la masa atómica de grupos adyacentes y la electronegatividad, mientras que entre los intermoleculares destaca la formación de puentes de hidrógeno, a pesar de que en muchos casos, el puente de hidrógeno también puede ser intramolecular. Los modos vibracionales más afectados por los puentes de hidrógeno son las vibraciones de tensión de los grupos donadores, los cuales disminuyen su frecuencia en varios cientos de números de onda, mientras que la frecuencia de vibración de los grupos aceptores, como por ejemplo el C=O, disminuye entre 5 y 25 cm^{-1} (Arrondo y col. 1993).

Dado que la frecuencia de vibración de un determinado enlace varía según su entorno molecular, existe una relación directa entre el estado o la estructura de una molécula y las frecuencias de vibración de sus grupos. Esto es lo que permite utilizar la técnica de espectroscopía de infrarrojo para el estudio de las transiciones de fase de los sistemas fosfolipídicos o para el estudio de la estructura de proteínas. En el caso del análisis de la estructura de las proteínas, a pesar de que la espectroscopía de infrarrojo no proporciona parámetros absolutos como la difracción de rayos X o la

espectroscopía de RMN bidimensional, sí permite un estudio rápido y sencillo de la estructura secundaria de las proteínas en disolución.

En los modernos equipos de espectroscopía infrarrojo, dado que utilizan una señal de tipo digital, el procesamiento de los datos se ha simplificado bastante, realizándose en ordenadores y pudiendo así determinar con una elevada precisión la frecuencia y la anchura de una banda (Kauppinen y col., 1981). Además se puede mejorar fácilmente la relación señal/ruido por medio de la realización de un número creciente de espectros. Uno de los factores que afecta a la relación señal/ruido anterior es la presencia de vapor de agua, la cual produce muchas bandas de vibración en las regiones de interés. Para evitar esto, se utilizan tampones preparados en agua deuterada y la cámara de medida se somete a un flujo continuo de aire seco.

1.4.1. Grupos vibracionales de fosfolípidos.

Las perturbaciones inducidas por diferentes factores sobre los fosfolípidos se pueden determinar mediante espectroscopía de infrarrojo a través del efecto que tienen sobre diferentes grupos vibracionales del lípido, como los grupos metilo y metileno de las cadenas hidrocarburadas, la región interfacial y la cabeza del grupo polar (Arrondo y col., 1993, Casal y Manstch, 1984). La tabla II.1 resume las principales vibraciones de los fosfolípidos.

a) Cadenas hidrocarburadas.

La frecuencia de las vibraciones de tensión simétrica y antisimétrica del grupo metileno ($\nu_s(\text{CH}_2)$ y $\nu_{as}(\text{CH}_2)$, respectivamente) depende de la conformación de las cadenas acílicas y responde a los cambios del estado de fase dependientes de la temperatura, concretamente a la relación de isómeros *trans/gauche* de las cadenas hidrocarburadas de los lípidos (Mantsch y McElhaney, 1991). De esta forma, la frecuencia de las vibraciones de tensión simétrica y antisimétrica de este grupo, cuando los lípidos experimentan la transición de fase de gel (isómeros *todo-trans*) a líquido-cristalina (isómeros *gauche*), aumenta desde 2849 y 2917 cm^{-1} , a 2853 y 2923 cm^{-1} , respectivamente (Tamm y Tatulian, 1997). Por otro lado, las vibraciones de tensión de los residuos metilo terminales, $\nu(\text{CH}_3)$, se sitúan a 2870 cm^{-1} (tensión simétrica, $\nu_s(\text{CH}_3)$) y 2956 cm^{-1} (tensión antisimétrica, $\nu_{as}(\text{CH}_3)$).

Por su parte, las vibraciones de deformación de los residuos metilo, CH_3 , producen bandas cercanas a 1464 cm^{-1} (deformación asimétrica) y a 1380 cm^{-1} (deformación simétrica). Las vibraciones de deformación del grupo metileno, CH_2 , produce bandas alrededor de 1470 cm^{-1} , cuyo número y frecuencia depende del empaquetamiento y la conformación de las cadenas acílicas (Mantsch y McElhaney, 1991).

Tabla II.1. Principales vibraciones de los fosfolípidos. Se muestra la localización de las vibraciones características, así como su asignación y simbología.

Número de onda (cm^{-1})	Asignación	Símbolo
2956	CH_3 tensión antisimétrica	$\nu(\text{CH}_3)$
2923	CH_2 tensión antisimétrica	$\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$
2870	CH_3 tensión simétrica	$\nu_s(\text{CH}_3)$
2853	CH_2 tensión simétrica	$\nu_s(\text{CH}_2)$
2195	CD_2 tensión antisimétrica	$\nu_{\text{as}}(\text{CD}_2)$
2090	CD_2 tensión simétrica	$\nu_s(\text{CD}_2)$
1750-1600	C=O tensión	$\nu(\text{C=O})$
1380	CH_3 deformación simétrica	$\delta_s(\text{CH}_3)$
1220-1240	PO^{2-} tensión antisimétrica	$\nu_{\text{as}}(\text{PO}^{2-})$
1160-1170	C-O tensión antisimétrica	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$
1090	PO^{2-} tensión simétrica	$\nu_s(\text{PO}^{2-})$
1070	R-O-P-O-R' tensión	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O-PO}^{2-})$

b) Región interfacial.

Las bandas más importantes originadas en la región interfacial de los lípidos aparecen en la región $1750\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ y se deben a las vibraciones de tensión del grupo carbonilo involucrado en el enlace éster, $\nu(\text{C=O})$. Estas bandas corresponden a cambios en su microambiente, como la formación de puentes de hidrógeno y la polaridad. Se han observado dos componentes en la banda del carbonilo de los fosfolípidos, uno centrado a 1742 cm^{-1} y otro a 1728 cm^{-1} . Los cambios en intensidad en la fase de los lípidos, observados en los componentes a alta y baja frecuencia del $\nu(\text{C=O})$ en función de la temperatura, se deben a los grupos carbonilos deshidratados e hidratados, respectivamente (Blume y col., 1988; Lewis y col., 1994).

c) *Cabeza polar.*

Las bandas vibracionales más características de la cabeza polar de los fosfolípidos son las que se originan a partir del grupo fosfato (PO_2^-). Este grupo fosfato es muy sensible a los puentes de hidrógeno y a las interacciones con cationes y péptidos. El modo de tensión antisimétrica del fosfato aparece aproximadamente a 1240 cm^{-1} en condiciones de deshidratación, mientras que en condiciones de hidratación disminuye a aproximadamente 1220 cm^{-1} (Wong y Mantsch, 1988). Por otro lado, el modo de vibración simétrica del fosfato aparece en torno a 1090 cm^{-1} (Arrondo y col., 1984) y es menos sensible a la hidratación, a diferencia del modo de vibración antisimétrica.

1.4.2. Modos vibracionales en péptidos y proteínas.

La espectroscopía de infrarrojo puede proporcionar información sobre la estructura de proteínas, pues se ha demostrado la correlación empírica entre la frecuencia de vibración y el motivo estructural predominante en proteínas que habían sido estudiadas por difracción de rayos X (Elliot y Ambrose, 1950).

Los enlaces amida (grupo CO-NH) de polipéptidos y proteínas presentan nueve posibles modos vibracionales característicos, llamados bandas amida, que se recogen en el espectro de infrarrojo: A (3300 cm^{-1}), B (3100 cm^{-1}), I (1650 cm^{-1}), II (1550 cm^{-1}), III (1300 cm^{-1}), IV (725 cm^{-1}), V (625 cm^{-1}), VI (600 cm^{-1}), VII (200 cm^{-1}). Estos modos vibracionales fueron descritos a partir del análisis de la molécula más sencilla con enlace peptídico, la N-metil-acetamida (Miyazawa y col., 1958). Estudios de éste y de otros modelos moleculares sencillos han permitido establecer las frecuencias características de cada banda amida y las contribuciones de las distintas vibraciones de enlace a cada una de ellas (Tabla II.2).

La banda amida I, que aparece entre 1600 y 1700 cm^{-1} , es el modo vibracional más usado para el análisis de la estructura secundaria de proteínas en disolución, ya que presenta mayor intensidad y la contribución de las cadenas laterales es menor (Arrondo y col. 1993). No obstante, se pueden utilizar otros modos, como las bandas amida II y amida III, para estos estudios estructurales.

Tabla II.2. Frecuencias características de las bandas amida. Se indica también las diferentes contribuciones de las distintas vibraciones de enlace a cada banda.

Modo	Frecuencia (cm ⁻¹)	Descripción*
A	3300	NH _s (100%)
B	3100	NH _s (100%)
I	1650	CO _s (80%), CN _s , CCN _d
II	1550	NH _{ib} (60%), CN _s (40%), CO _{ib} , CC _s , NC _s
III	1300	CN _s (40%), NH _{ib} (30%), CC _s (20%), CO _{ib}
V	725	NH _{ob} , CN _t
IV	625	CO _b (40%), CC _s (30%), CNC _d
VI	600	CO _{ob} , CN _t
VIII	200	NH _{ob} , CN _t , CO _{ob}

(*) s, vibración de tensión; d, deformación; ib, flexión en el plano; ob, flexión fuera del plano; t, torsión.

La banda amida I corresponde principalmente a la vibración por tensión del grupo C=O de los enlaces peptídicos (80%), y además tiene algunas contribuciones de la vibración por tensión del enlace CN (10-15%), y de la vibración de deformación del enlace CCN (5-10%). La frecuencia real de la amida I viene determinada por la geometría de la cadena polipeptídica y de los puentes de hidrógeno.

La banda amida II se debe a la vibración de flexión del grupo N-H (60%) y a la de tensión del grupo C-N (40%). Ambas incluyen vibraciones debidas a grupos presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos.

La banda amida III proviene de la vibración de tensión de los grupos C-N (40%) y C-C (20%) y de la vibración de flexión del grupo N-H (30%).

La introducción de aparatos cada vez más avanzados, como los basados en el interferómetro de Michelson (llamados espectrofotómetros de infrarrojo por transformada de Fourier, FT-IR), permite obtener espectros de mayor resolución, con una alta relación señal/ruido. Además, requieren menor cantidad de muestra, lo

cual es otra ventaja pues se evitan los posibles problemas de agregación molecular a altas concentraciones de proteína. De esta forma, es posible obtener cada vez mejores espectros de proteínas en disolución.

Por otro lado, las moléculas de H₂O presentes en el tampón de disolución, absorben en toda la región infrarroja del espectro, incluso en la banda amida I, donde muestran una fuerte absorción a 1645 cm⁻¹. Para evitar contribución del H₂O, el estudio suele hacerse inicialmente utilizando tampones de disolución preparados con agua deuterada (D₂O). En estas condiciones, las fuerzas de los enlaces varían y las frecuencias de vibración del agua se desplazan a frecuencias menores y así, la banda que aparecía a 1645 cm⁻¹ en H₂O, aparece ahora a 1215 cm⁻¹ en D₂O y ya no coincide con la banda amida I, la cual ahora se denomina banda amida I'. El intercambio H/D afecta a los componentes de la amida I, lo que puede ser útil en el proceso de asignación.

Existe una relación entre la frecuencia o posición de la banda amida I y el tipo de estructura secundaria de una proteína. Se han asignado las frecuencias vibracionales características de distintos tipos de estructura secundaria mediante el uso de diversos modelos polipeptídicos, como α-poli-L-alanina, β-poli-L-alanina o el giro β de CH₃-CO-(Ala)₄-NH-CH₃, entre otros (Bandekar, 1992).

La Tabla II.3 muestra las frecuencias asignadas a las componentes de la banda amida I en H₂O y en D₂O (Arrondo y Goñi, 1999). Algunas estructuras presentan diferentes frecuencias en cada medio. Así, el espectro obtenido de una proteína puede tener una forma diferente de H₂O a D₂O, sin que eso indique que se vea afectada la estructura o la actividad biológica de la proteína.

Las vibraciones centradas alrededor de 1650 cm⁻¹ se consideran características de estructuras helicoidales. Así, se admite la asignación de hélice α a las vibraciones en la región 1648-1658 cm⁻¹ (Arrondo y col., 1993), aunque se han encontrado excepciones como la estructuras helicoidales con diferentes ángulos diedros que aparecen en la bacteriorrodopsina y cuya vibración está centrada en 1660 cm⁻¹ (Rothschild y col., 1979), o la hélice 3₁₀, con bandas de absorción a diferente frecuencia en función de la longitud de la hélice, siendo las más cortas las que vibran

alrededor de 1660 cm^{-1} y los segmentos más largos los que lo hacen a menor número de onda (Reisdorf y col., 1994).

Las vibraciones más frecuentes de las estructuras extendidas se encuentran alrededor de 1630 cm^{-1} y a 1675 cm^{-1} en D_2O (1630 cm^{-1} y 1690 cm^{-1} en H_2O) (Arrondo y Goñi, 1999), aunque se han observado bandas a menores números de onda, las cuales han sido asignadas a estructuras extendidas formadas por residuos que están implicados en puentes de hidrógeno intermoleculares, como en el caso de contactos monómero-monómero (Arrondo y col., 1988; 1994b), proteínas agregadas (Surewicz y col., 1990; Muga y col., 1993) o contactos con lípidos en las lipoproteínas (Herzyck y col., 1987; Goormaghtigh y col., 1989).

La estructura desordenada aparece a 1657 cm^{-1} en H_2O , solapándose con la hélice α . En cambio, en D_2O la vibración de esta estructura se desplaza a 1643 cm^{-1} . Las bandas atribuidas a bucles (Fabian y col., 1992) o a acoplamientos entre hélices (Heimburg y col., 1996; Reisdorf y col., 1996) también aparecen hacia 1644 cm^{-1} .

Finalmente, entre $1660\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ se encuentran diferentes bandas asignadas a giros de manera no específica (Krimm y col., 1980; Mantsch y col., 1993).

Tabla II.3. Asignación de las componentes de la banda amida I a cada tipo de conformación estructural.

Asignación	Frecuencia (cm^{-1})	
	H_2O	D_2O
giros β	1700-1660	1700-1660
hoja β antiparalela	1690	1675
hélice α	1648-1658	1650
estructura desordenada	1656	1643
bucles	1644	1643
hoja β	1632	1632

Las diferencias en el número de onda para una misma estructura o, incluso, algunas diferencias con los cálculos teóricos o los resultados obtenidos con homopolipéptidos, pueden deberse a la complejidad proteica, ya que cambios

pequeños en el entorno, la estabilización de las proteínas por interacciones de tipo terciario o la presencia de estructuras distorsionadas pueden influir en la frecuencia de vibración del enlace peptídico.

Si bien la asignación de frecuencias para modelos polipeptídicos es relativamente sencilla, en el caso de proteínas esto es bastante más complejo, ya que la banda amida I está constituida por la superposición de diferentes componentes individuales que pueden relacionarse con un elemento estructural concreto. Sin embargo, hay técnicas que facilitan esta asignación, como son:

- La instrumentación por transformada de Fourier, que permite obtener espectros de alta relación señal/ruido.
- Los procedimientos matemáticos de desconvolución y derivación (2ª derivada), que permiten la separación de los componentes a expensas de aumentar el ruido, dando las posiciones aproximadas de cada uno.

1.4.2.1. Obtención de los espectros de infrarrojo y tratamiento de los datos.

Los espectros se obtuvieron en un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Bruker Vector 22 equipado con un detector de mercurio-cadmio-telurio (MCT), recogiendo 128 interferogramas a una resolución nominal de 2 cm^{-1} y apodización triangular. Se utilizaron los espectros con una alta relación señal/ruido entre la referencia y la muestra, obtenidos en el mismo período de tiempo (doble haz). La cámara de medida del espectrómetro se sometió a una purga continua con aire seco para eliminar el vapor de agua atmosférico.

Las muestras se colocaron entre dos ventanas de CaF_2 con espaciadores de teflón de $25\ \mu\text{m}$ (Specac, Kent, Reino Unido) y se montaron en una célula termostatizada Specac 20710, colocada en el interior de la cámara de muestra del espectrómetro. A continuación, las muestras se equilibraron a la temperatura de comienzo del barrido, durante 20 minutos antes de comenzar la adquisición de los espectros. En las mismas condiciones se recogieron los espectros de los tampones utilizados en cada caso.

Todos los espectros recogidos fueron analizados y manipulados utilizando los programas Spectra-Calc y Grams/32 (Galactic Industries Corp., Salem, NH). La contribución de la disolución tampón se restó en cada caso a los espectros de las muestras.

En el caso del análisis de la estructura secundaria de las proteínas, el tratamiento de los datos y la descomposición de las bandas se realizó de acuerdo con los procedimientos propuestos previamente (Arrondo y col., 1989; 1994a). Así, se utilizaron técnicas matemáticas de aumento de resolución, las cuales, a pesar de su nombre, no aumentan la resolución espectral, sino que disminuyen la anchura de todas las bandas componentes del espectro, de manera que aquéllas que estaban solapadas se resuelven ahora como bandas separadas. Las técnicas más utilizadas en la espectroscopía de infrarrojo son la *desconvolución* y la *derivación* (segunda derivada) y se utilizan para calcular el número y las posiciones aproximadas de las distintas componentes de la banda amida I, así como su anchura y altura. Tanto la desconvolución como la obtención de la segunda derivada producen la amplificación del ruido y del vapor de H₂O, por lo que el grado de estrechamiento de las bandas se encuentra limitado por la relación señal/ruido del espectro. La optimización de los parámetros se debe realizar empíricamente, buscando la mejor resolución con el mínimo aumento del nivel de ruido. Lo más útil es aplicar ambas operaciones y comparar los resultados. Para la desconvolución se definen dos parámetros, la anchura de banda y el factor de aumento de resolución, *k*. Suelen tomarse valores de anchura entre 15 y 20 cm⁻¹ y entre 1,5 y 2,5 para *k*. En el caso del programa Grams/32 (Galactic Industries Corp., Salem, NH), se utilizó un factor γ de 8-10 (16-20 cm⁻¹) y un suavizado de 50-60%. La derivación, por su parte, viene caracterizada por la potencia y por el punto de corte, los cuales están relacionados con el grado de derivación y con el porcentaje de información procesado, respectivamente. Se suele utilizar una derivada de Savitzky-Golay de segundo grado y un suavizado de 7 a 13 cm⁻¹ de anchura de banda.

Para detectar y cuantificar las distintas componentes estructurales de la banda amida I, se utilizó el *método basado en el ajuste de bandas* (Curvefit, Grams 32, Galactic Industries, Salem, NH, E.E.U.U.). La banda amida I' del espectro original (1600-1700 cm⁻¹), a la que se le había restado la contribución del tampón y se había

corregido la línea de base, se sometió a este programa de ajuste de bandas. Este programa requiere inicialmente la introducción de diferentes parámetros (número, posición, anchura, altura y forma de las bandas componentes). El número y posición de las componentes había sido estimado previamente mediante la desconvolución y la segunda derivada (Kauppinen y col., 1981; Cameron y Moffat, 1987). Además, la segunda derivada nos proporcionó información sobre la anchura (Cameron y Moffat, 1984). Para la altura se asignó un 90% de la intensidad en el espectro original a las bandas en los extremos y en el máximo de la banda amida I', y un 70% al resto de componentes (Abbot y col., 1991). Finalmente, para determinar la forma de la banda se utilizó la aproximación de una mezcla de curva gaussiana (90%) y lorenciana (10%). Estos parámetros se utilizaron como valores iniciales en un proceso iterativo de mínimos cuadrados, cuyo resultado fue una combinación de valores que reproducía el perfil de la banda amida I' obtenida experimentalmente. Después, el porcentaje de cada estructura se calculó como el porcentaje del área bajo cada banda componente respecto al área total de la amida I'.

En la Figura II.7 se muestran los espectros completos del dominio C2 de PKC γ (línea continua), de su tampón (línea discontinua) y de la sustracción (espectro inferior) en D₂O.

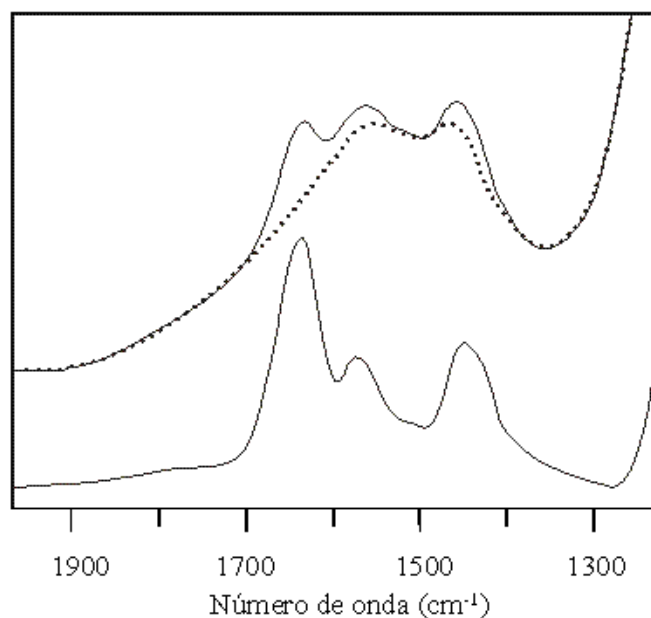


Figura II.7. Espectros de infrarrojo del dominio C2 de PKC γ . En la parte superior se muestran los espectros obtenidos de la proteína (línea continua), de su tampón (línea discontinua), mientras que en la parte inferior aparece la sustracción de ambos en D₂O.

En la Figura II.8 se muestran los espectros del dominio C2 de PKC γ en la región de la banda amida I en D₂O (A), su segunda derivada (B) y su desconvolución (C). Ambos procedimientos matemáticos dan aproximadamente el mismo número de bandas y, prácticamente, en las mismas posiciones. Como ya se ha comentado anteriormente, puede ocurrir un desplazamiento de la frecuencia de alguna de las bandas del espectro en D₂O con respecto al espectro en H₂O.

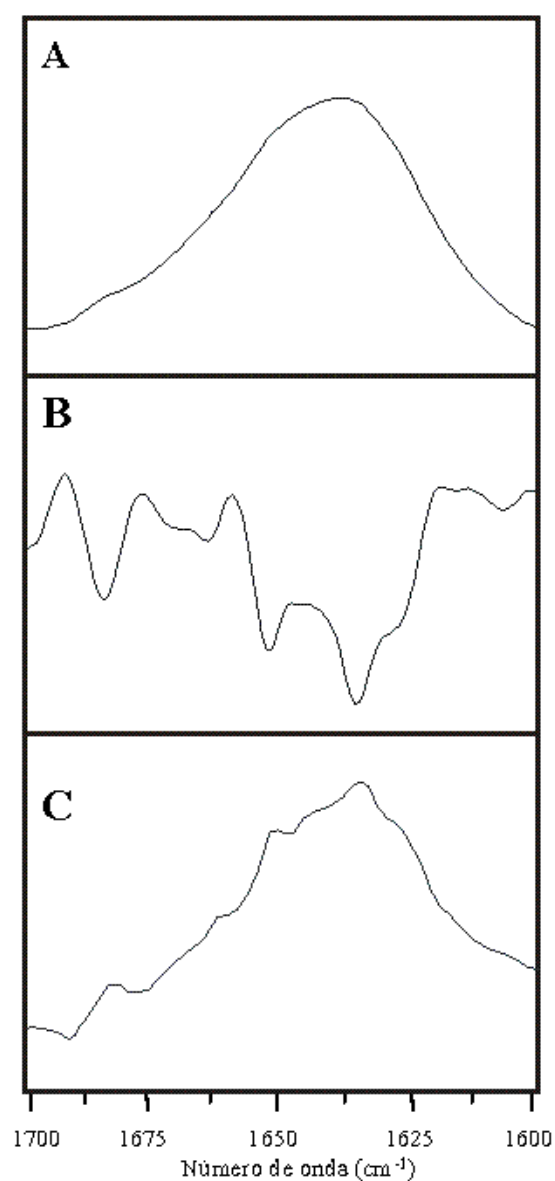


Figura II.8. Espectros de infrarrojo del dominio C2 de PKC γ . Se muestra la banda amida I' de los espectros de la proteína en tampón D₂O (A), su segunda derivada (B) y su desconvolución (C).

1.4.2.2. Espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional (2D-IR).

La espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional (2D-IR) es una técnica donde una intensidad espectral es representada en función de dos variables espectrales independientes, como por ejemplo, el número de onda, la frecuencia o la longitud de onda. Los ejes de las variables espectrales independientes definen un plano bidimensional y, de esta forma, la intensidad espectral puede ser dibujada a lo largo de un tercer eje. Mediante este tipo de análisis, se puede obtener frecuentemente información adicional muy útil, que no era disponible a partir de los espectros convencionales unidimensionales.

El concepto básico de la espectroscopía bidimensional se desarrolló inicialmente en el campo de la resonancia magnética nuclear hace más de veinte años (Bax, 1982; Ernst y col., 1987). Un experimento de espectroscopía bidimensional se puede llevar a cabo con un espectrofotómetro convencional introduciendo una perturbación externa relativamente lenta en el sistema de interés. Esta perturbación no tiene por qué ser una serie de pulsos ópticos ultracortos. Seleccionando un fenómeno relativamente lento como perturbación, se pueden observar las respuestas características de un sistema utilizando un espectrofotómetro convencional.

1.4.2.2.1. Espectroscopía bidimensional basada en una perturbación.

La Figura II.9 muestra el esquema básico de un experimento de espectroscopía de correlación bidimensional basado en una perturbación externa. En una medida típica de espectroscopía unidimensional, una prueba electromagnética se selecciona y se utiliza para estudiar el sistema de interés. En cambio, la correlación bidimensional aprovecha una perturbación externa adicional aplicada durante la medida para estimular el sistema de interés.

La respuesta del sistema a la perturbación aplicada manifiesta con frecuencia una respuesta con unas variaciones características en el espectro óptico, lo cual se conoce como *espectro dinámico*. En un experimento típico, se recoge de forma secuencial una serie de espectros dinámicos inducidos por la perturbación, los cuales son manipulados matemáticamente mediante un esquema sencillo para obtener el espectro de correlación bidimensional deseado. La perturbación aplicada puede ser el tiempo (correlación bidimensional resuelta en el tiempo, Noda, 1989; Marcott y col.,

1994), la temperatura (Ozaki y col., 1997), la presión (Magtoto y col., 1999), la concentración (McClure y col., 1996), diversos factores de estrés (Noda y col., 1999) o el campo eléctrico (Ataka y col., 1998), entre otros parámetros. Cada perturbación afecta al sistema en una manera única y selectiva, gobernada por mecanismos de interacción específica que relacionan el estímulo macroscópico con las respuestas a nivel microscópico o molecular de los constituyentes individuales del sistema.

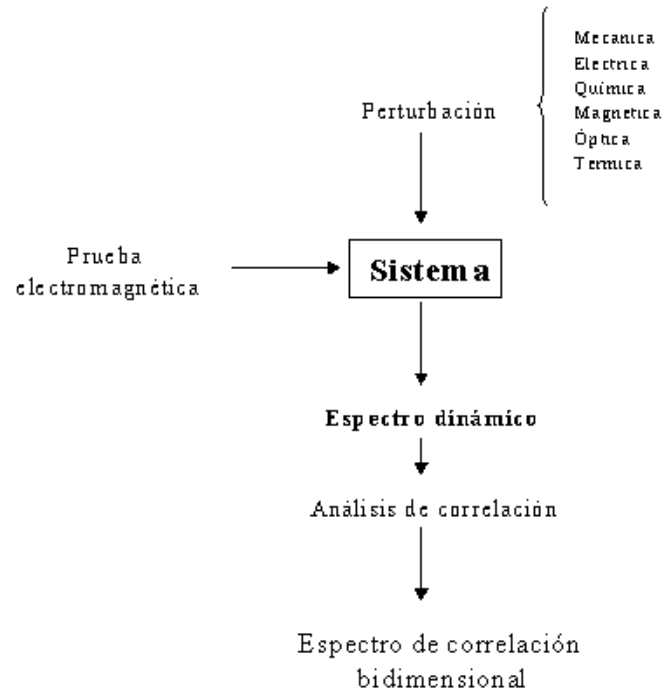


Figura II.9. Esquema general para la obtención de un espectro de correlación bidimensional. Tomado de Noda y col. (2000).

1.4.2.2.2. Análisis de correlación bidimensional

a) Espectro dinámico.

Consideremos un cambio en la intensidad espectral inducido por una perturbación, $y(\nu, t)$, observado durante un intervalo de una variable externa t , entre T_{\min} y T_{\max} .

Esta variable externa t puede ser el tiempo o cualquier otra medida física, como la temperatura, la presión, la concentración o el voltaje, entre otros. La variable espectral ν puede ser cualquier índice utilizado en espectroscopía, como el número de onda, la longitud de onda o el ángulo de difracción de rayos-X.

El espectro dinámico $\tilde{y}(v,t)$ de un sistema afectado por una perturbación externa se define formalmente como

$$\tilde{y}(v,t) = \begin{cases} y(v,t) - \tilde{y}(v), & \text{para } T_{m\acute{a}x} \geq t \geq T_{m\acute{i}n} \\ \mathbf{0}, & \text{para el resto} \end{cases} \quad (1)$$

donde $\tilde{y}(v)$ es el espectro de referencia del sistema.

La selección de un espectro de referencia adecuado no está fijada, aunque en la mayoría de los casos, se suele fijar $\tilde{y}(v)$ como el *espectro estacionario* o el *espectro medio* definido por

$$\tilde{y}(v) = \frac{1}{T_{m\acute{a}x} - T_{m\acute{i}n}} \int_{T_{m\acute{i}n}}^{T_{m\acute{a}x}} y(v,t) dt \quad (2)$$

En algunos casos, es posible seleccionar el espectro de referencia como un espectro observado en un punto de referencia fijado ($t = T_{ref}$), el cual puede ser el estado original antes de aplicar la perturbación, al inicio de la perturbación, al final de la misma o después de equilibrarse una vez finalizada la perturbación. En otros casos se puede tomar incluso la media de los espectros recogidos durante la aplicación de la perturbación. Incluso puede ser considerado como cero, en cuyo caso el espectro dinámico es idéntico a la variación observada en la intensidad espectral.

b) Función de correlación bidimensional.

La correlación bidimensional es simplemente una comparación cuantitativa de las variaciones en las intensidades espectrales observadas en dos variables espectrales diferentes durante un intervalo de observación entre $T_{m\acute{i}n}$ y $T_{m\acute{a}x}$. El espectro de correlación se puede expresar como

$$X(v_1, v_2) = \langle \tilde{y}(v_1, t) \cdot \tilde{y}(v_2, t) \rangle \quad (3)$$

La intensidad de correlación bidimensional $X(v_1, v_2)$ representa la medida de una comparación funcional de las variaciones en las intensidades espectrales $\tilde{y}(v,t)$ medidas en las diferentes variables espectrales, v_1 y v_2 , durante un intervalo fijo de la

variable externa t . Los símbolos $\langle \rangle$ indican una operación matemática, conocida como función de correlación, diseñada para comparar la dependencia de las dos variables v_1 y v_2 en t . El hecho de que la función de correlación definida en la ecuación (3) sea calculada entre las variaciones de intensidad espectrales medidas de las variables independientes v_1 y v_2 , lleva a la naturaleza bidimensional de este análisis de correlación particular.

Se adopta la convención de tratar $X(v_1, v_2)$ como el número complejo

$$X(v_1, v_2) = \Phi(v_1, v_2) + i\Psi(v_1, v_2) \quad (4)$$

el cual comprende dos componentes ortogonales (una real y otra imaginaria), conocidas como intensidad de correlación bidimensional *síncrona* y *asíncrona*, respectivamente. La intensidad de correlación bidimensional *síncrona* $\Phi(v_1, v_2)$ representa la similitud general entre dos variaciones de intensidad espectral separadas medidas en diferentes variables conforme cambia el valor de t . Por otro lado, la intensidad de correlación bidimensional *asíncrona* $\Psi(v_1, v_2)$ puede ser considerada como la medida de la diferencia general de las variaciones de intensidad espectral.

c) Correlación bidimensional generalizada.

La correlación bidimensional generalizada define formalmente la intensidad de correlación *síncrona* y *asíncrona* como

$$X(v_1, v_2) = \frac{l}{\pi(T_{max} - T_{min})} \int_0^{\infty} \tilde{Y}_1(\omega) \cdot \tilde{Y}_2^*(\omega) d\omega \quad (5)$$

El término $\tilde{Y}_1(\omega)$ es la transformación de Fourier de la variación de intensidad espectral $\tilde{y}(v_1, t)$ observada en la variable v_1 y se define como

$$\tilde{Y}_1(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{y}(v_1, t) e^{+i\omega t} dt \quad (6)$$

La frecuencia de Fourier ω representa la componente de frecuencia individual de la variación de $\tilde{y}(v_1, t)$ medida a lo largo de la variable externa t .

De igual forma, el término conjugado, $\tilde{Y}_2^*(\omega)$, es la componente de Fourier de la variación de intensidad espectral $\tilde{y}(v_2, t)$ observada en la variable v_2 y definida como

$$\tilde{Y}_2^*(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{y}(v_2, t) e^{+i\omega t} dt \quad (7)$$

d) Computación numérica de los espectros bidimensionales.

Para una serie m de espectros dinámicos recogidos durante el intervalo de la variable externa t entre T_{min} y T_{max} en incrementos equivalentes, $\Delta t = (T_{max} - T_{min})/(m-1)$, la intensidad de correlación bidimensional sincrona viene definida por la ecuación

$$\Phi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}_j(v_1) \cdot \tilde{y}_j(v_2) \quad (8)$$

donde $\tilde{y}_j(v_i)$ es la intensidad espectral en un punto de la variable física t_j .

$$\tilde{y}_j(v_i) = \tilde{y}(v_i, t_j) \quad i = 1, 2, \dots \quad (9)$$

Para una serie de datos con espectros que no se encuentran espaciados en t de forma equivalente, debe realizarse un ajuste adecuado para convertir los datos en una serie espaciada de forma equivalente.

La computación de la intensidad de correlación bidimensional asincrónica es más complicada. Hay diferentes maneras de estimar el espectro asincrónico, siendo el método más eficiente y simple actualmente para estimar el espectro asincrónico el que viene dado por

$$\Psi(v_1, v_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}_j(v_1) \cdot \sum_{k=1}^m N_{jk} \cdot \tilde{y}_k(v_2) \quad (10)$$

El término N_{jk} corresponde al elemento de la fila j y columna k de la matriz de transformación discreta de Hilbert-Noda dada por

$$N_{jk} = \begin{cases} 0, & \text{si } j = k \\ \frac{1}{\pi (k-j)}, & \text{en otro caso} \end{cases} \quad (11)$$

1.4.2.2.3. Propiedades de los espectros de correlación bidimensional.

a) Espectro sincrónico.

La intensidad de un espectro de correlación bidimensional sincrónico $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ representa los cambios coincidentes o simultáneos de las variaciones de intensidad espectral medidas en ν_1 y ν_2 durante el intervalo de la variable externa definida t entre T_{min} y T_{max} . La Figura II.10 muestra un ejemplo esquemático de un espectro de correlación bidimensional sincrónico dibujado como mapa de contorno. Este espectro es siempre simétrico respecto a la diagonal ($\nu_1 = \nu_2$). Aparecen picos de correlación tanto sobre la diagonal como fuera de ella.

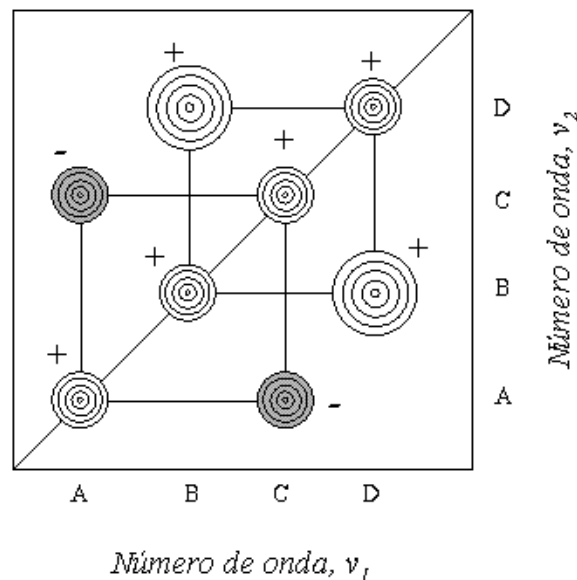


Figura II.10. Esquema del mapa de contorno de un espectro de correlación sincrónico. En la diagonal aparecen los autopicos, mientras que fuera de ella se encuentran los picos cruzados. El signo de los picos se muestra al lado de cada uno. Los picos de signo negativo aparecen sombreados, mientras que los positivos aparecen de blanco. A su vez, se representan los dos cuadrados de correlación posibles, entre los números de onda A y C y los números de onda B y D.

La picos localizados en la diagonal se denominan *autopicos* (en la Figura II.10, A, B, C y D), son siempre positivos y su intensidad corresponde matemáticamente a la función de autocorrelación de las variaciones en la intensidad espectral observadas durante el intervalo entre T_{min} y T_{max} . La magnitud de la intensidad de un autopico representa el alcance global de la variación en la intensidad espectral observada. Así, cualquier región del espectro que cambie su intensidad en gran medida bajo una determinada perturbación, presentará un fuerte autopico,

mientras que las regiones que permanecen prácticamente constantes desarrollan pocos o ningún autopico. Es decir, un autopico representa la susceptibilidad general de la correspondiente región espectral a cambiar la intensidad espectral cuando una perturbación externa se aplica al sistema.

Los picos localizados en posiciones diferentes a la diagonal se denominan *picos cruzados* y representan cambios coincidentes o simultáneos de las intensidades espectrales observadas en función de las variables ν_1 y ν_2 . Tal cambio sincronizado sugiere la posible existencia de un origen relacionado o acoplado de las variaciones en la intensidad espectral. Con frecuencia es útil dibujar un cuadrado de correlación uniendo los pares de picos cruzados situados en las partes opuestas respecto de la diagonal con los autopicos correspondientes para mostrar así la existencia de una variación coherente de las intensidades espectrales. En el ejemplo de la Figura II.10, los autopicos A y C están correlacionados de forma síncrona, al igual que los autopicos B y D. De esta forma, se pueden dibujar dos cuadrados de correlación diferentes entre los números de onda citados anteriormente (A con C y B con D).

El signo de los picos cruzados puede ser positivo o negativo, según sea el cambio observado en las intensidades espectrales. Así, si las intensidades espectrales de las dos variables correspondientes a las coordenadas del pico cruzado aumentan o disminuyen a la vez, en función de la variable externa t en el intervalo observado, el signo será positivo. En cambio, el signo del pico cruzado será negativo cuando una de las intensidades espectrales aumente mientras la otra disminuya. En el ejemplo, el signo del pico cruzado de coordenadas (A, C) es negativo, lo cual indica que la intensidad de una banda aumenta mientras la otra disminuye. En cambio, el signo del pico cruzado (B, D) es positivo, lo cual muestra que ambas bandas aumentan o disminuyen a la vez.

b) Espectro asíncrono.

La Figura II.11 muestra un ejemplo de espectro de correlación bidimensional asíncrono. La intensidad de un espectro asíncrono representa los cambios secuenciales de las intensidades espectrales medidas en las variables ν_1 y ν_2 .

A diferencia del espectro síncrono, el espectro asíncrono es antisimétrico respecto a la diagonal. No tiene autopicos y consiste exclusivamente en *picos*

cruzados localizados en posiciones distintas de la diagonal, cuyo signo puede ser positivo o negativo. Se pueden formar los cuadrados de correlación asínrona uniendo los picos cruzados con las correspondientes posiciones de la diagonal. En el ejemplo, se observa correlación asínrona entre las bandas A y B, A y D, B y C y C y D. Así, podemos formar cuatro cuadrados de correlación asínrona entre los mismos.

Los picos cruzados de correlación asínrona sólo se forman si las intensidades de dos variables espectrales cambian de forma desfasada entre sí, es decir, con retraso o con adelanto una respecto a la otra. Esta característica es especialmente útil a la hora de diferenciar bandas solapadas que surgen de señales espectrales de diferentes orígenes. Por ejemplo, se pueden diferenciar así las diferentes contribuciones a la intensidad espectral procedentes de los distintos componentes individuales de una mezcla compleja, los grupos funcionales químicos que experimentan diferentes efectos bajo la acción de un factor externo o los materiales no homogéneos formados por múltiples fases.

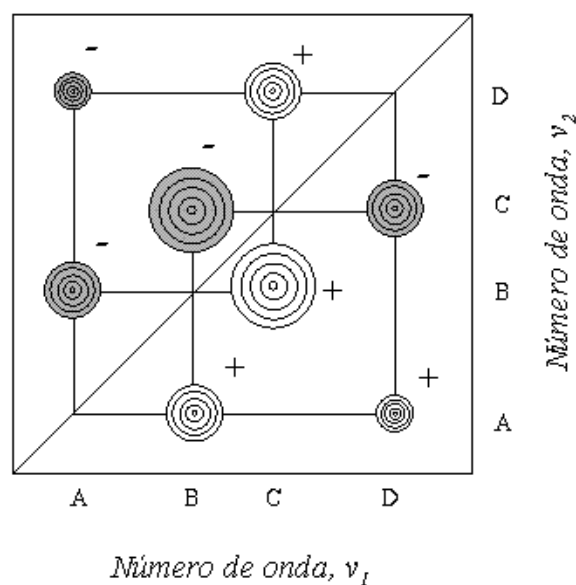


Figura II.11. Esquema del mapa de contorno de un espectro de correlación asínrona. Se muestran los picos cruzados, junto con su signo, fuera de la diagonal. Los picos negativos aparecen sombreados, mientras que los positivos aparecen de blanco. A su vez, se representan los cuatro posibles cuadrados de correlación, entre los números de onda A-B, A-D, B-C y C-D.

El signo de un pico cruzado asínrono es positivo si el cambio en la intensidad espectral de ν_1 ocurre predominantemente antes que el cambio en ν_2 , en el

orden secuencial de t . En cambio, el signo será negativo si el cambio ocurre después de ν_2 . Esta regla, no obstante, debe cambiarse si la correlación síncrona en esa posición es negativa, es decir si $\Phi(\nu_1, \nu_2) < 0$ (Noda y col., 2000). Así, en el ejemplo de la Figura II.11 y teniendo en cuenta el mapa de contorno del espectro de la correlación síncrona (Figura II.10), los cambios en la intensidad de las bandas A y C ocurren después de los cambios en B y D.

1.5. Espectroscopía de fluorescencia.

Las moléculas son capaces de emitir luz como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética. Este fenómeno nos puede proporcionar información sobre aspectos de la estructura y dinamismo de las moléculas, así como del entorno que las rodea.

Cuando una molécula absorbe un fotón, un electrón de la misma pasa desde el estado fundamental de mínima energía al llamado estado excitado. Una vez en este estado excitado, el electrón tiende a volver al estado fundamental de diferentes formas. El electrón excitado pierde su exceso de energía por colisión y cae a un nivel vibracional de energía menor, hasta llegar a cualquiera de los niveles vibracionales del estado fundamental. En este proceso, el electrón emite energía en forma de radiación electromagnética en el proceso que se conoce como fluorescencia (Lakowicz, 1983).

Las moléculas capaces de excitarse y emitir posteriormente fluorescencia se conocen como moléculas fluorescentes o fluoróforos. Estas moléculas fluorescentes pueden ser constituyentes del sistema o puede tratarse de sondas moleculares artificiales externas al sistema en estudio.

Existen diversas moléculas biológicas que contienen fluoróforos intrínsecos o naturales. Así, diversos cofactores, como el NADH, la riboflavina, los nucleótidos de flavina (FMN y FAD), y los aminoácidos aromáticos de las proteínas son fluorescentes.

No obstante, con frecuencia, las propiedades naturales de fluorescencia en las macromoléculas en estudio no son las adecuadas y pueden no ser sensibles a los fenómenos que se desea estudiar. Para solucionar este problema, se añaden fluoróforos extrínsecos al sistema para aumentar las propiedades espectrales. De esta forma, se emplean compuestos como la carboxifluoresceína, compuestos derivados del dansilo o sondas hidrofóbicas de membranas como el 1,6-difenilhexatrieno (Lakowicz, 1983).

Existen diferentes técnicas de aplicación de la fluorescencia que utilizan los cambios ocurridos en las propiedades fluorescentes de algunas moléculas para reflejar la dinámica y el entorno que rodean a esas moléculas. Entre ellas destacan el estudio de la fluorescencia en estado estacionario, la atenuación de la fluorescencia, la polarización y la transferencia de energía, entre otras.

1.5.1 Fluorescencia intrínseca.

Una gran variedad de moléculas biológicas posee fluoróforos intrínsecos. En las proteínas, los aminoácidos aromáticos (triptófano, *Trp*, tirosina, *Tyr*, y fenilalanina, *Phe*) pueden contribuir a la fluorescencia en la región ultravioleta.

La fluorescencia de las proteínas es excitada máximamente en la longitud de onda de absorción de 280 nm o incluso en longitudes de onda mayores. Así, las proteínas generalmente absorben la luz a una longitud de onda cercana a 280 nm y emiten fluorescencia de forma máxima en el intervalo que se encuentra entre 320 y 350 nm.

Como *Phe* no se excita a 280 nm, no se considera como una sonda apropiada para estudios de fluorescencia en proteínas. Por lo tanto, la absorción de luz de las proteínas a 280 nm se debe básicamente a los residuos de *Trp* y *Tyr*.

Tyr es un aminoácido altamente fluorescente en solución, pero cuando se encuentra en proteínas su emisión es más débil.

Trp es el aminoácido con mayor rendimiento cuántico de todos. Los residuos de *Trp* constituyen el 90% de la fluorescencia total de una proteína. Este fluoróforo

natural es altamente sensible a la polaridad del entorno que le rodea, por lo que se puede utilizar para estudiar diversos fenómenos, como la interacción con membranas y la unión de ligandos, entre otros. De hecho, la longitud de onda del máximo de emisión de fluorescencia del *Trp* puede utilizarse para describir la polaridad del ambiente o entorno en que se encuentra. Así, un máximo de emisión a baja longitud de onda (alrededor de 330 nm) es indicativo de un *Trp* en un entorno no polar (por ejemplo, en contacto con las cadenas hidrocarburadas de fosfolípidos), mientras que un máximo de emisión a alta longitud de onda (cercano a 355 nm) refleja un entorno polar alrededor del *Trp*, quizás cercano a los grupos de cabeza de los fosfolípidos (Heitz y col., 2002).

La unión de ligandos a la proteína puede provocar determinados cambios estructurales en la molécula que se traduzcan en una mayor o menor exposición de los residuos de *Trp*, lo cual afecta a las propiedades fluorescentes de dicha proteína. De esta forma, la fluorescencia intrínseca debida a los residuos de *Trp* de la proteína se puede utilizar para analizar la unión de distintos ligandos a la misma. Para ello puede analizarse el cambio de la fluorescencia intrínseca relativa (ΔF_{rel}) en presencia de distintas concentraciones de ligando mediante la ecuación

$$\Delta F_{rel} = \frac{F_1 - F_{min}}{F_{max} - F_{min}}$$

donde F_1 es la emisión de fluorescencia observada a una determinada concentración de ligando, F_{min} representa la emisión de fluorescencia intrínseca de la proteína en ausencia de ligando y F_{max} es la máxima emisión de fluorescencia en presencia de una concentración de ligando saturante.

1.5.2. Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET).

La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) es una técnica muy útil para determinar interacciones entre biomoléculas. Básicamente este fenómeno consiste en la transferencia de la energía del estado excitado desde un fluoróforo donante a un aceptor. De esta manera, un fluoróforo es excitado a una determinada longitud de onda y emite la consecuente fluorescencia, la cual es quien

excita al segundo fluoróforo, el cual a su vez emite fluorescencia. Así, tras excitar al fluoróforo donante, se recoge la emisión de fluorescencia del fluoróforo aceptor sólo en el caso de que haya transferencia de energía. Esta transferencia ocurre sin la intervención de fotones y es principalmente debida al resultado de las interacciones dipolo-dipolo entre el donante y el aceptor (Lakowicz, 1983).

La eficiencia de la transferencia de energía depende del solapamiento del espectro de emisión de fluorescencia del donante con el espectro de absorción del aceptor, la orientación relativa de los dipolos de transición del donante y el aceptor y de la distancia entre ambas moléculas. La Figura II.12 muestra el solapamiento de los espectros de emisión y excitación del aminoácido *Trp* (que actuaría como donador) y de un compuesto derivado de la molécula de dansilo (que actuaría como aceptor).

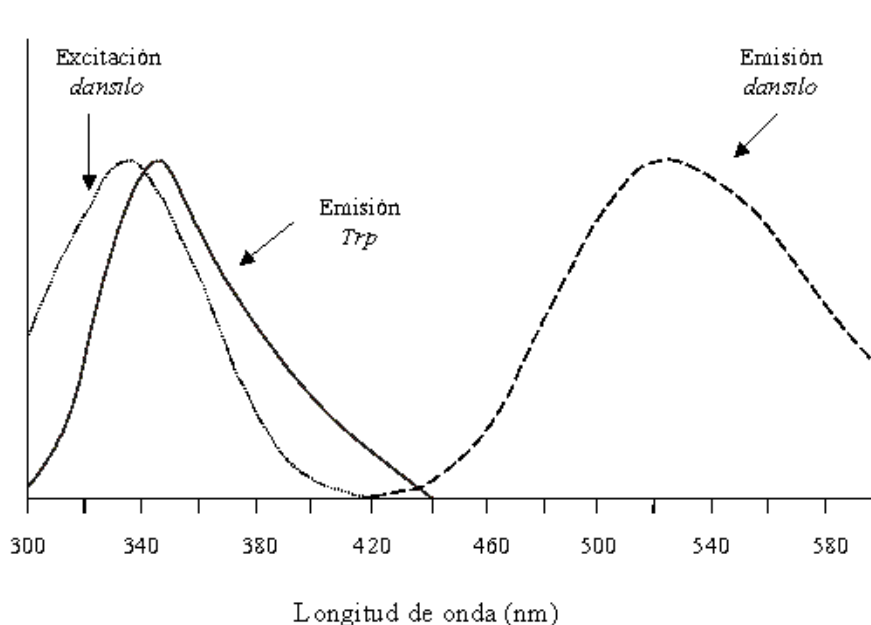


Figura II.12. Solapamiento de los espectros de emisión y excitación del par utilizado en transferencia de energía. Se muestra el espectro de emisión del *Trp* (línea continua) y los espectros de excitación (línea punteada) y de emisión (línea rayada) de un compuesto derivado del dansilo.

Esta eficiencia de la transferencia de energía de fluorescencia (E) se puede medir experimentalmente y viene definida por la siguiente ecuación

$$E = \frac{\tau_D - \tau}{\tau_D} \approx \frac{F_D - F}{F_D}$$

donde τ y τ_D son los tiempos de vida de fluorescencia del fluoróforo dador en presencia del aceptor y en ausencia del aceptor respectivamente, y F y F_D son la emisión de fluorescencia del dador en presencia y ausencia del aceptor, respectivamente, en cada una de las condiciones experimentales utilizadas.

La eficiencia de la transferencia de energía nos permite calcular la distancia entre el fluoróforo dador y el aceptor, r , de acuerdo con la teoría de Förster (1966), de la siguiente forma

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

A partir de esta ecuación podemos deducir r

$$r = R_0 \left(\frac{1 - E}{E} \right)^{1/6}$$

R_0 es un parámetro conocido como la *distancia crítica de Förster* donde la transferencia de energía es del 50 %.

Dada la dependencia de la distancia existente entre los fluoróforos para la transferencia de energía, esta técnica ha sido utilizada ampliamente para medir distancias, así como para detectar interacciones entre moléculas (Corbalán-García y col., 1994; Cubbit y col., 1995; Hovius y col., 2000; Singleton y col., 2002). De esta forma, podemos medir la unión de una proteína a membranas en función de distintas condiciones experimentales (como la presencia de distintos ligandos en diferentes concentraciones). En estos casos, el *Trp* de la proteína sirve como fluoróforo donante y una molécula fluorescente en las membranas como aceptor. Se suelen utilizar derivados del dansilo incluidos en las vesículas como aceptor. La Figura II.13 muestra la estructura de un derivado de dansilo utilizado en este tipo de pruebas.

Así, la transferencia de energía sólo será posible cuando ambos fluoróforos se encuentren lo suficientemente cerca (0-100 Å). En estos casos se puede estudiar la interacción entre una proteína y membranas modelo de acuerdo con las ecuaciones de la eficiencia de transferencia de energía anteriormente mencionadas.

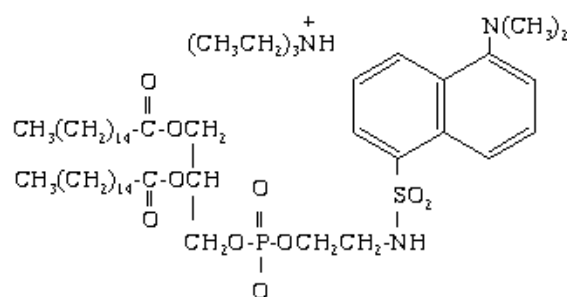


Figura II.15. Estructura molecular de la sal de trietilamonio de *N*-(5-dimetilamino-naftalén-1-sulfonyl)-1,2-dihexadecanil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (dansil-DHPE o d-PE).

2. MÉTODOS GENERALES.

2.1 Obtención del dominio C2 de la PKC α , β II y γ .

2.1.1. Construcción de los plásmidos de expresión.

Los ADN copia de PKC α y PKC β II se obtuvieron gracias a la amable cesión de los Drs. Nishizuka y Ono (Universidad de Kobe, Kobe, Japón), mientras que el ADN copia de PKC γ se obtuvo gracias a la amable cesión del Dr. Tobias Meyer (Escuela Médica Universitaria de Stanford, Stanford, CA, Estados Unidos). Todos los plásmidos de expresión obtenidos se confirmaron por secuenciación de ADN en los laboratorios de Sistemas Genómicos (Parque Tecnológico de Valencia, Paterna, Valencia).

El proceso de construcción de los plásmidos de expresión se puede dividir en las siguientes etapas:

a) *Amplificación por PCR y digestión de los fragmentos de ADN correspondientes al dominio C2 de las PKC α , β II y γ .*

El fragmento de ADN correspondiente al dominio C2 de la PKC α , formado por los residuos aminoacídicos comprendidos entre el 155 y el 293, se amplificó por PCR con los oligonucleótidos de secuencias 5'-CAAGAATTC AAGAGGGGGC GGATTTAC-3' y 5'-CAAAAGCTTGTATT CACCCTCCTCTTG-3' (Corbalán-García y col., 1999).

Para la obtención por PCR del fragmento de ADN correspondiente al dominio C2 de la PKC β II, formado por los residuos aminoacídicos comprendidos entre el 157 y el 295, se utilizaron los oligonucleótidos de secuencias 5'-AAGGAATTCAACAGAACGCCGT-3' y 5'-AATAAGCTTTCATCCTTCCGGCGG-3'.

Finalmente, para el fragmento de ADN correspondiente al dominio C2 de la PKC γ , formado por los residuos aminoacídicos comprendidos entre el 156 y el 298, en la reacción de PCR se utilizaron los oligonucleótidos de secuencias 5'-AAGGAATTCATACAGAGCGCCGTG-3' y 5'-ACCAAGCTTTCAGCTGCAGTTGTC-3' (Kohout y col., 2002).

Todos los fragmentos obtenidos se sometieron a digestión con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Los fragmentos obtenidos por PCR y así digeridos presentaron unos tamaños de 414 pb para el dominio C2 de la PKC α , 417 pb para el dominio C2 de la PKC β II y 429 bp en el caso del dominio C2 de la PKC γ .

b) *Corte de los vectores de expresión con las mismas enzimas de restricción*

Se utilizaron los vectores de expresión bacteriana pET-28c(+) (Novagen Inc., WI, Estados Unidos) y pGEX-KG (Guan y Dixon, 1991). Estos vectores contienen, básicamente, un origen de la replicación (ori), un gen de resistencia a antibiótico (kanamicina y ampicilina, respectivamente), el gen que codifica el represor de lac (lacI), un promotor de la transcripción (f1 y Ptac, respectivamente), al que se une el represor lacI, una secuencia que codifica la proteína a la que se fusionará el dominio C2 y que permitirá su purificación (una cola de 6 residuos de His y GST, respectivamente), un sitio de unión de trombina y los sitios de corte de las enzimas de restricción dentro de una región con múltiples secuencias de corte (Figura II.14).

Los dos plásmidos se cortaron con las mismas enzimas de restricción (EcoRI y HindIII) que los fragmentos de ADN clonados. Posteriormente, se sometieron a un tratamiento con fosfatasa (CIP) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) para evitar la religación al eliminar los grupos fosfato de los extremos 5'.

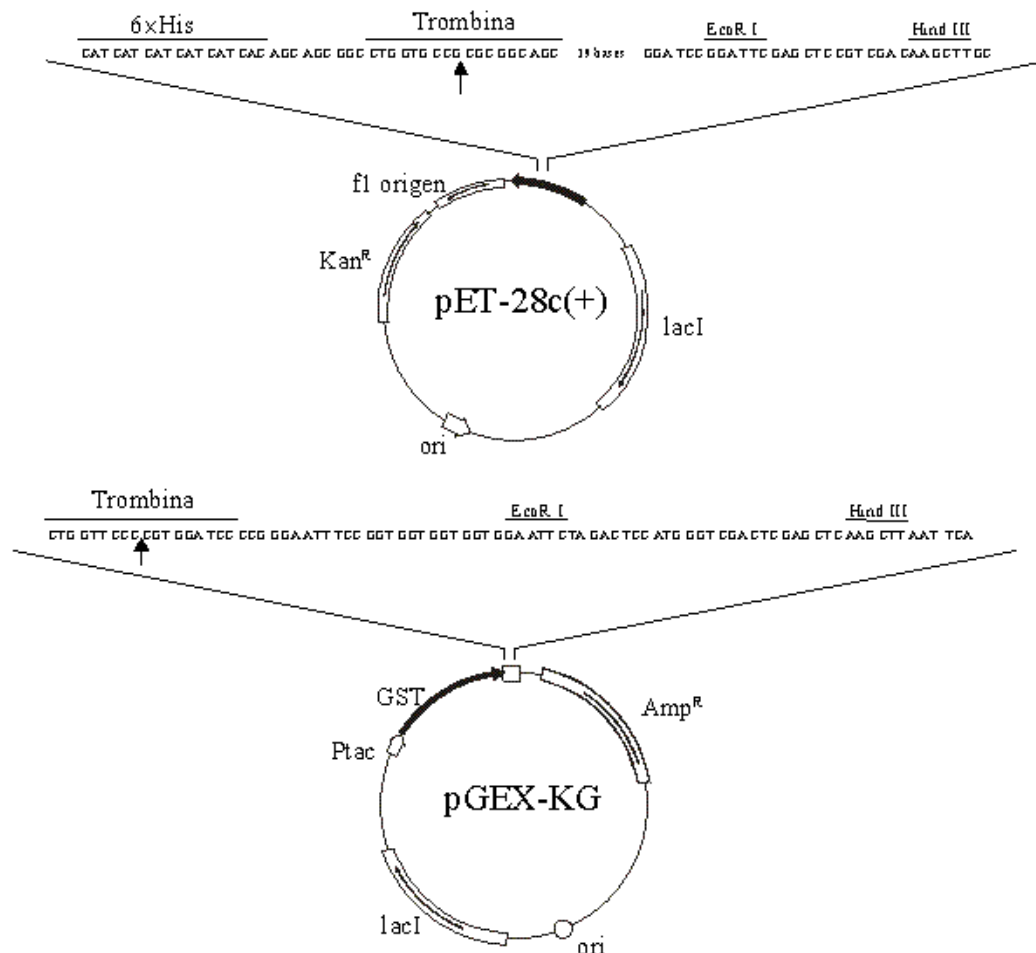


Figura II.14. Esquema de los plásmidos pET-28c(+) y pGEX-KG. Básicamente contienen un promotor de transcripción (fl o Ptac), un gen regulador del promotor que codifica para el represor de lac (lacI), un sitio de origen de replicación (ori), un gen de resistencia a kanamicina o ampicilina, un gen que codifica para la proteína a la que se fusionará el dominio C2 (6xHis o GST), un sitio con múltiples secuencias de corte para enzimas de restricción, entre las que destacan las secuencias que reconocen EcoR I y Hind III, y un sitio de unión a trombina.

c) *Ligación de los vectores de expresión y los fragmentos de ADN*

A continuación se realizó la reacción de ligación de los fragmentos obtenidos por PCR con cada uno de los plásmidos utilizando la ligasa T4 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), durante 16 h a 16°C.

d) *Selección de los plásmidos que han incorporado el fragmento de ADN*

Los plásmidos con el fragmento de ADN amplificado por PCR se seleccionaron mediante transformación en células DH5α de *Escherichia coli*

utilizando el protocolo propuesto por Cohen y col. (1973). De cada una de las placas donde crecieron las células transformadas se seleccionaron 12 colonias y se crecieron en agitación en 5 ml de medio LB, con el antibiótico correspondiente (para el vector pET-28c(+), kanamicina 50 $\mu\text{g/ml}$, y para el vector pGEX-KG, ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$), durante 16 h a 37°C. A continuación, los cultivos bacterianos se centrifugaron (2.500 \times g, 10 min) para sedimentar las células, descartándose los sobrenadantes. Las células se lisaron y se purificó el ADN plasmídico siguiendo el protocolo de la lisis alcalina propuesto por Birnboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981).

Finalmente se comprobó si contenían el inserto mediante la digestión del ADN plasmídico con las mismas enzimas de restricción (EcoRI y HindIII) y la determinación de los tamaños de los fragmentos resultantes en un gel de agarosa. El plásmido que había incluido el fragmento amplificado por PCR produjo dos bandas, una de aproximadamente 5 Kpb, correspondiente al vector cortado, y otra de 414 pb, 417 pb o 429 pb, debida al dominio C2 de la PKC α , de la PKC β II o de la PKC γ respectivamente. Los plásmidos que no incorporaron el fragmento amplificado por PCR sólo produjeron una banda de un tamaño aproximado de 5 Kb. El ADN plasmídico que incorporó el inserto de interés se utilizó para transformar nuevas cepas de *E. coli* donde se expresarían las proteínas.

Básicamente, todo este proceso se muestra en el esquema de la Figura II.15.

2.1.2. Expresión y purificación de los dominios 6 \times His-C2 de la PKC α , β II y γ .

Para expresar las proteínas de fusión 6 \times His-C2-PKC α / β II/ γ se utilizaron las células transformadas BL21(DE3) de *E. coli*, con las que se inoculó un cultivo de 1 l de medio LB con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) que se incubó en agitación a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0,6–0,8 unidades de absorbancia medida a 600 nm. Entonces, se indujo la producción de la proteína añadiendo isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), a una concentración de 0,5 mM al cultivo y manteniéndolo en agitación durante 6 h a 30°C para expresar las proteínas.

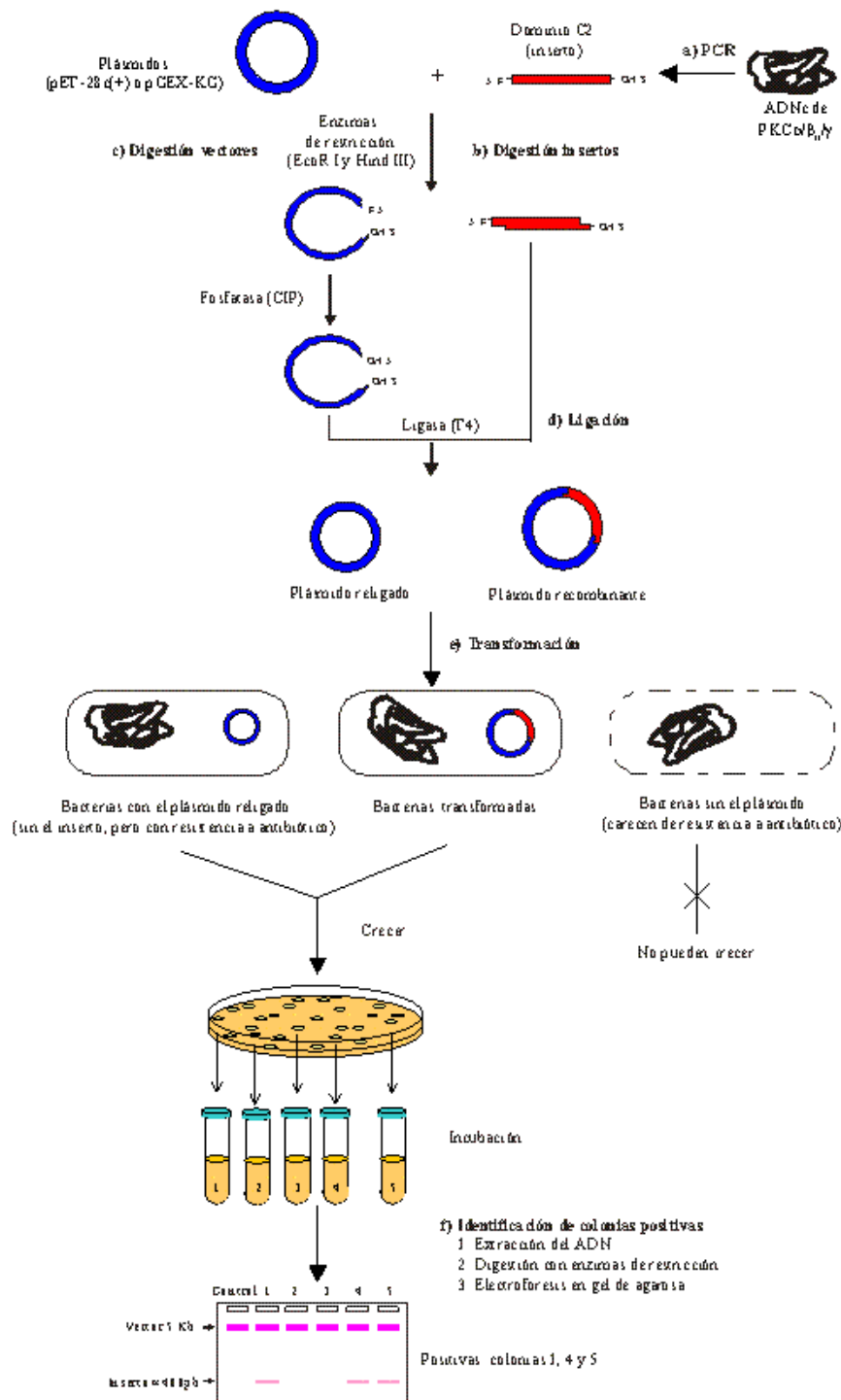


Figura II.15. Esquema de la construcción de plásmidos de expresión. El fragmento de ADN y los plásmidos utilizados se cortan con las mismas enzimas de restricción (EcoR I y Hind III) y se ligan con ligasa T4. Después de la transformación de células competentes con el ADN se realiza la búsqueda de colonias positivas que habrán incorporado el plásmido con el fragmento. Las colonias negativas serán aquellas que contengan el plásmido religado. Tras purificarse el ADN plasmídico, se digiere con las mismas enzimas de restricción y se comprueba en un gel de agarosa el tamaño de los fragmentos obtenidos. Las colonias positivas serán aquellas que contengan dos fragmentos, uno grande de 5 Kb y otro pequeño de unas 400 pb.

Pasado este tiempo, el cultivo se centrifugó a 10.000×g durante 20 min, desechándose el sobrenadante. El precipitado celular se resuspendió entonces en 50 ml de tampón de lisis con inhibidores de proteasas (benzamidina 10 mM, PMSF 1 mM e inhibidor de tripsina 10 µg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). El tampón de lisis contenía Hepes 25 mM pH 7,4 y NaCl 100 mM para la purificación del dominio C2 de la PKC α , MOPS 20 mM pH 6,8 y NaCl 300 mM para el dominio C2 de la PKC β II y Tris-HCl 25 mM pH 8,0 NaCl 100 mM para el dominio C2 de la PKC γ .

Las células se lisaron mediante ultrasonidos (10 ciclos x 10 seg) y la suspensión resultante se volvió a centrifugar (20.000×g, 30 min, a 4°C). Para optimizar la extracción de la proteína, el precipitado celular se volvió a procesar de igual manera con 25 ml del tampón de lisis anterior.

Los dos lisados celulares se mezclaron e incubaron con 2 ml de agarosa Ni-NTA® (QIAGEN, Hilden, Alemania) en agitación suave, durante 2 h a 4°C. Esta resina presenta alta afinidad por el tallo de 6×His. Después, la resina se lavó con 20 ml de tampón de lisis con imidazol 20 mM (Calbiochem, Alemania) y se cargó en una columna. Las proteínas unidas se eluyeron con concentraciones crecientes de imidazol (6, 6 y 4 ml del mismo tampón, con imidazol 50, 250 y 500 mM, respectivamente) y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones con proteína de fusión se comprobaron mediante tinción con azul de Coomassie de un gel SDS-PAGE (15% gel separador).

Las fracciones con proteína pura se mezclaron e incubaron con trombina 0,001 U/µg proteína (Sigma) durante 1,5 h a temperatura ambiente para cortar el tallo de His. A continuación, la disolución se incubó durante 30 min a 4°C con 30 µl de resina p-aminobenzamidina (Sigma), para eliminar la trombina. Tras desechar la resina por centrifugación, el tampón presente en la disolución se intercambió con tampón de lisis para diluir el imidazol, hasta llegar a una concentración de 20 mM. Para ello se utilizaron unidades de filtro de centrifuga Ultrafree-5 (Millipore Inc., Bedford, MA, Estados Unidos). La disolución resultante se incubó de nuevo con 50 µl de resina de Ni durante 20 min a 4°C para eliminar la posible proteína no cortada con trombina.

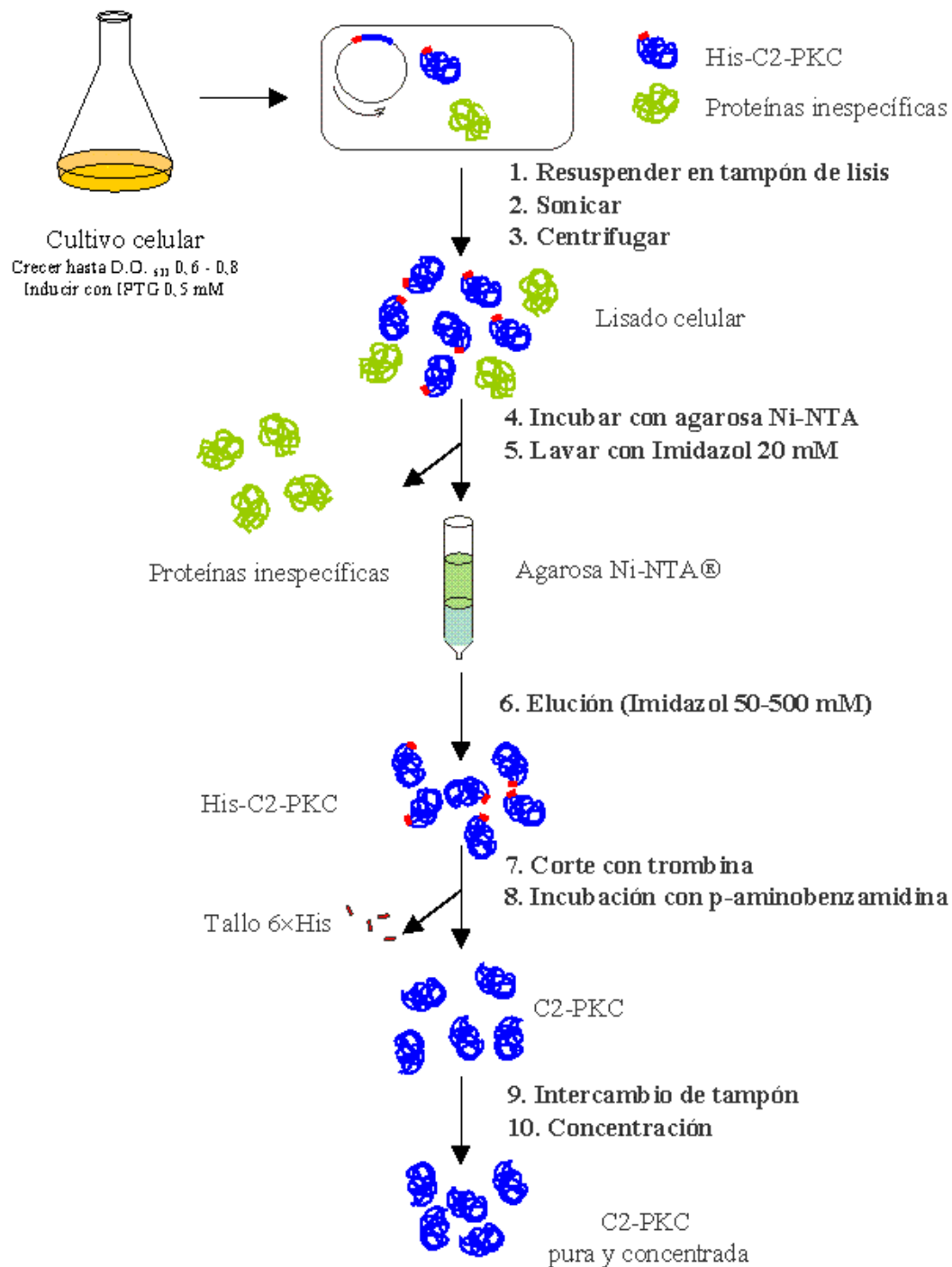


Figura II.16. Esquema del proceso de purificación del dominio C2 de PKC α , β II y γ . Tras expresar la proteína en un cultivo bacteriano, las células se lisaron y después de eliminar el material insoluble por centrifugación, el lisado celular se incubó con la resina de agarosa Ni-NTA®, de alta afinidad por el tallo de seis His. El lavado de la resina con imidazol 20 mM permitió eliminar las proteínas inespecíficas. La proteína de fusión se eluyó con imidazol 50-500 mM. El tallo de 6×His se digirió con trombina. Finalmente, tras eliminar la trombina con la resina de p-aminobenzamida, se intercambiò el tampón de la proteína y se concentró en una unidad de filtración.

Para finalizar, la disolución se intercambió y concentró con el mismo tampón y baja sal (NaCl 20 mM), usando de nuevo una unidad de filtración Ultrafree-5 (Millipore Inc., Bedford, MA, Estados Unidos). La pureza de la proteína se verificó mediante tinción de plata de un gel de poliacrilamida-SDS (15% gel separador) y su concentración se calculó por el método del ácido bicinconínico (Smith y col., 1985). La proteína se conservó a -80°C en presencia de glicerol 10% (v/v).

El esquema del proceso de purificación de las proteínas de fusión 6xHis-C2-PKC α / β II/ γ está representado en el esquema de la Figura II.16.

2.2. Cultivo de células.

2.2.1. Cultivo de células de mamífero.

Las células HEK293 (células de epitelio de riñón humano) se crecieron en placas de 9 cm de diámetro a 37°C y en una atmósfera de 10% de CO_2 , utilizando medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) con un suplemento de 10% de suero bovino fetal (SBF), L-glutamina 2 mM y una mezcla de antibióticos (estreptomicina 50 $\mu\text{l/ml}$ y penicilina 50 U/ml).

2.2.2. Cultivo de células de insecto.

Las células de insecto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Co., CA, Estados Unidos) se crecieron a 27°C en frascos de 25cm^2 (Sarstedt Inc., Newton, NC, Estados Unidos) y en agitación en matraces de diferentes tamaños. En todos los casos se añadió medio de cultivo Sf-900 II (Gibco, Invitrogen Corp., Life Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) con un suplemento de L-glutamina 2 mM (Sigma) y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (penicilina 100U/ml, estreptomicina 0,1mg/ml, anfotericina B 0,25 $\mu\text{g/ml}$).

2.3. Obtención de PKC α completa.

El ADN copia de PKC α se obtuvo gracias a la amable cesión de los Drs. Nishizuka y Ono (Universidad de Kobe, Kobe, Japón). Todos los plásmidos de

expresión obtenidos se confirmaron por secuenciación de ADN en los laboratorios de Sistemas Genómicos (Parque Tecnológico de Valencia, Paterna, Valencia).

2.3.1. En células de mamífero HEK293.

2.3.1.1. Construcción de los plásmidos de expresión.

La proteína PKC α completa, así como el mutante (D246/248N) que tiene afectado el dominio C2, donde los dos ácidos aspárticos de las posiciones 246 y 248 están sustituidos por asparraginas, se clonaron, expresaron y purificaron como se describió previamente (Conesa-Zamora y col., 2000).

Brevemente, el mutante se generó mediante el proceso de mutagénesis dirigida propuesto por Saiki y col (1988), ya comentado anteriormente. Los fragmentos de ADN, tanto de la forma silvestre como del mutante, se subclonaron en el vector de expresión en mamífero pCGN, el cual se obtuvo gracias a la amable cesión del Dr. Tanaka (Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos). Este vector posee, básicamente, un sitio origen de replicación, un gen de resistencia a ampicilina, el promotor del citomegalovirus y un sitio de clonación múltiple que permitió la expresión de genes fusionados al extremo 3' del epítipo de hemaglutinina (HA) (Tanaka y Herr, 1990).

2.3.1.2. Transfección con ADN plasmídico.

Una vez que los cultivos en placa de las células HEK293 alcanzaron alta confluencia (aproximadamente el 80%, $8-10 \times 10^6$ células), se procedió a realizar la transfección. La transfección se llevó a cabo siguiendo el método de la precipitación de fosfato cálcico descrito por Wigler y col. (1977). Para cada placa de 9 cm de diámetro se prepararon dos disoluciones:

Disolución A: 0,54 ml de tampón Hepes 50 mM y 11 μ l de Na₂HPO₄·2 H₂O 1,5 mM.

Disolución B: 0,48 ml de tampón TE (pH 8,0), 10 μ g del ADN correspondiente subclonado en el vector pCGN y 66 μ l de CaCl₂ 2M.

La disolución B se añadió sobre la A produciéndose la formación del precipitado de fosfato cálcico con el ADN. La mezcla se dejó reposar 10 min y entonces se añadió 1 ml de esta solución a cada placa de cultivo.

Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO₂ durante 14 h y entonces se eliminó el medio y las placas se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS). Finalmente, se añadió medio nuevo y las células se dejaron en incubación a 37°C en una atmósfera de 10% de CO₂ durante unas 48 h.

2.3.1.3. Obtención de la proteína de lisados celulares.

Las células HEK293 se lavaron dos veces con PBS, se recogieron y se centrifugaron. Las células se resuspendieron en 0,4 ml de tampón de lisis CoIP, que contenía Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Tritón X-100 al 1%; glicerol al 10%; NaF 50 mM; Na₃VO₄ 1 mM; PMSF 200 µM; benzamidina 10 mM e inhibidor de tripsina 10 µg/ml (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, Estados Unidos).

El lisado se pasó 6 veces a través de una jeringuilla de insulina para conseguir homogeneización. Posteriormente se centrifugó a 13.000×g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se utilizó en ensayos de actividad quinasa y de unión a membranas. La cantidad relativa de las proteínas expresadas se cuantificó mediante electroforesis en gel, electrotransferencia e inmunoanálisis del epítipo HA.

2.3.2. En células de insecto Sf9.

2.3.2.1. Obtención del baculovirus recombinante.

Para expresar la proteína completa PKCα se utilizó el sistema de infección/expresión del baculovirus recombinante.

Este sistema se ha utilizado recientemente para la expresión de genes heterólogos en cultivos de células y larvas de insecto. Los genes heterólogos situados bajo el control transcripcional del promotor de la polihedrina del virus de la

polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) son expresados abundantemente en las fases de infección tardías. En muchos casos, las proteínas recombinantes son procesadas, modificadas y dirigidas a sus localizaciones celulares concretas.

Entre las ventajas del sistema de expresión del baculovirus encontramos que:

- Se consiguen altos niveles de expresión de genes heterólogos y las proteínas obtenidas son solubles y se recuperan fácilmente de las células infectadas.
- Se pueden producir complejos proteicos hetero-oligoméricos infectando simultáneamente las células con dos o más tipos de virus.
- Los baculovirus son más seguros que otros tipos virales, ya que tienen un espectro de hospedadores restringido (no infectan a vertebrados).
- AcNPV se propaga en líneas celulares de *Spodoptera frugiperda* o *Trichoplusia ni*, las cuales pueden crecer bien en suspensión, de forma que pueden obtenerse grandes cantidades de proteína.

Los baculovirus recombinantes se construyen en dos pasos. El primero de ellos se basa en la inserción del gen de interés mediante una transposición específica desde el plásmido que contiene el gen hasta un vector del baculovirus (bácmido) que se expresa en bacterias *E. coli*. El plásmido pFastBac HT (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos) se utiliza para expresar proteínas con un tallo de polihistidina (6×His) que pueden ser purificadas fácil y rápidamente mediante resinas de afinidad. El gen de interés a expresar se inserta en un sitio de clonación múltiple del plásmido, aguas abajo del promotor específico del baculovirus. Mediante la transposición del elemento Tn7 desde el plásmido a su sitio específico en el bácmido, el gen de interés también se incluye en el bácmido. Esta introducción se lleva a cabo interrumpiendo el gen de expresión del péptido *lacZα* en el bácmido, de forma que en presencia de reactivos como el Bluo-gal (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos), las colonias con el bácmido recombinante serán blancas sobre un fondo de bacterias azules que albergan el bácmido inalterado.

Una vez identificadas las células con el báculo recombinante, éste se aísla y se introduce, en una segunda fase, en células de insecto. Un pequeño porcentaje de la progenie viral (del 0,1 al 1%) es recombinante, con el gen heterólogo insertado en el genoma viral mediante recombinación homóloga *in vivo*. Las disoluciones virales ($>10^7$ pfu/ml) pueden ser utilizadas para infectar cultivos celulares nuevos para la expresión, purificación y análisis de la proteína.

El proceso en concreto de la obtención del baculovirus recombinante presenta varias etapas.

a) *Inserción del gen de PKC α en el vector de expresión.*

El gen de PKC α se introdujo en el vector de expresión pFASTBAC HTb (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos), utilizando los sitios de corte de las enzimas de restricción XbaI y KpnI (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Este vector contiene, básicamente, un origen de replicación (pUC ori); un gen de resistencia a antibiótico (ampicilina); una señal de poliadenilación de SV40 (SV40 pA); el elemento de transposición Tn7 que contiene el gen de resistencia al antibiótico gentamicina; un promotor de la transcripción (P_{PH}, promotor de la polihedrina); una secuencia que codifica un tallo de seis residuos de His, donde se insertará el gen de interés y que facilitará su purificación; un sitio de unión de la proteasa recombinante rTEV; y los sitios de corte de las diversas enzimas de restricción dentro de una región con múltiples secuencias de corte (Figura II.17).

El ADN plasmídico se utilizó para transformar células competentes DH5 α de *E. coli* de manera similar a la explicada anteriormente en este mismo capítulo. Las colonias positivas se identificaron mediante el análisis por digestión con las mismas enzimas de restricción del ADN plasmídico aislado de las células crecidas en placa, de forma similar a como se explicó anteriormente.

b) *Transposición del ADN plasmídico recombinante.*

Una vez identificadas las colonias positivas, se utilizó su ADN plasmídico recombinante para la transposición en células competentes *E. coli* DH10BAC (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos). Estas células contienen el báculo parental bMON14272 y el plásmido ayudante pMON7124. El primero

posee un origen de replicación mini-F, un gen de resistencia a kanamicina, un sitio de unión de Tn7 y el factor de complementación *lacZ α* . El plásmido ayudante posee la región de transcripción *tnsABCD* que codifica las proteínas de transposición necesarias para la transposición de Tn7 desde el plásmido donante al sitio diana del báculo parental (precisamente la región de unión de Tn7, incluida en el fragmento que codifica *lacZ α*). Cuando las células competentes DH10BAC se transforman con el plásmido donante con el gen de interés, se forma una molécula plasmídica compuesta, gracias a la participación del plásmido ayudante, la cual contiene la secuencia clonada de interés insertada en el fragmento de *lacZ α* del báculo parental.

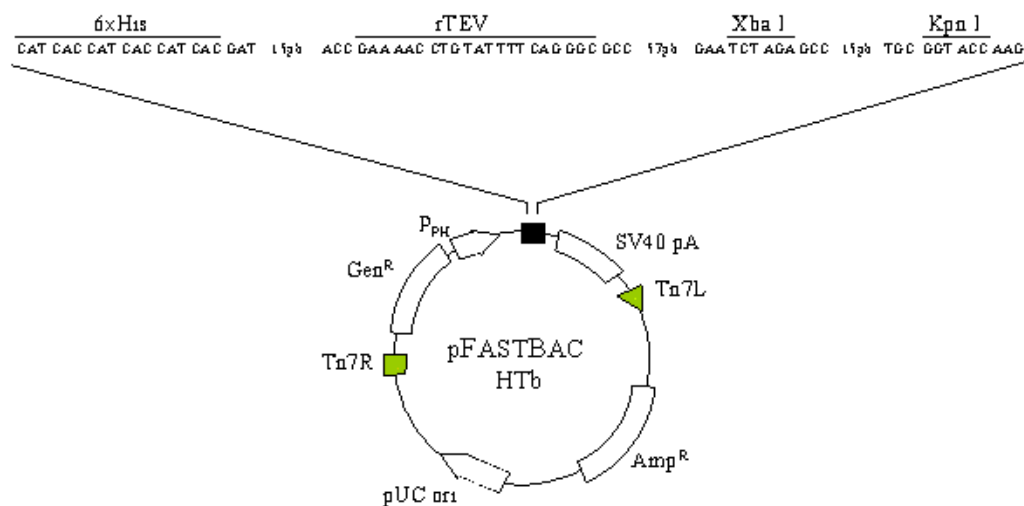


Figura II.17. Esquema del plásmido pFASTBAC HTb. Básicamente contiene un sitio de origen de replicación (pUC ori), un gen de resistencia a ampicilina, el transposón Tn7 con el gen de resistencia a gentamicina, una señal de poliadenilación (SV40 pA), un promotor fuerte de la transcripción (P_{PH}), un gen que codifica para la proteína a la que se fusionará el fragmento de ADN de interés (6xHis), un sitio con múltiples secuencias de corte para enzimas de restricción, entre las que destacan las secuencias que reconocen Xba I y Kpn I, y un sitio de unión a la proteasa recombinante rTEV.

Para obtener el báculo recombinante, se lleva a cabo una transformación similar a la comentada con anterioridad en este mismo capítulo (Cohen y col., 1973). Básicamente, este procedimiento consistía en añadir el ADN plasmídico a 100 μl de suspensión de células competentes bacterianas DH10BAC. Tras añadir el ADN, las células competentes se incubaron en hielo durante 30 min. A continuación se

sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 seg, poniéndose de nuevo en hielo durante 2 min. Entonces se añadió 1 ml de medio de cultivo SOC. Este medio SOC contenía 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl, 0,19 g de KCl, 3,6 g de glucosa, 0,95 g de MgCl₂, por litro de disolución, ajustando el pH a 7 con NaOH. Tras añadir el medio SOC, las células se incubaron en agitación a 37°C durante 5-6 h. Finalmente, las bacterias se sembraron en placas de medio LB con agar, los antibióticos kanamicina (50µg/ml), gentamicina (7µg/ml) y tetraciclina (10µg/ml), Bluo-gal (100µg/ml) (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos) y IPTG (40µg/ml) (Roche). Las placas se incubaron a 37°C durante 16-24 h.

Las colonias positivas, es decir, las que han incluido el báculo recombinante, aparecieron de color blanco sobre un fondo de células de color azul, debido a la interrupción del gen *LacZα*.

c) Aislamiento del plásmido de ADN recombinante

Se seleccionaron varias colonias de color blanco y se crecieron en agitación en 2 ml de medio LB, con los antibióticos (kanamicina 50 µg/ml, gentamicina 7µg/ml y tetraciclina 10µg/ml), durante 16 h a 37°C. A continuación, los cultivos se centrifugaron (2.500×g, 5 min), descartándose los sobrenadantes. Las células se lisaron y se purificó el ADN plasmídico siguiendo el protocolo ya comentado anteriormente (Birnboim y Doly, 1979; Ish-Horowicz y Burke, 1981).

Finalmente se comprobó si contenía el fragmento de interés sometiendo a las muestras a una reacción de PCR, utilizando unos oligonucleótidos específicos del ADN de PKCα (los utilizados en el proceso de amplificación del dominio C2 de PKCα descrito anteriormente en este mismo capítulo), y analizando los productos obtenidos en un gel de agarosa para ADN.

d) Transfección de las células de insecto *Sf9*.

La transfección de las células de insecto *Sf9* se realizó mediante el método del fosfato cálcico (Wigler y col., 1997) descrito anteriormente. Básicamente, se preparó una placa de cultivo de 3,5 cm de diámetro con unos 2×10⁸ células. Una vez depositadas las células, el medio se cambió a medio de cultivo TC-100 (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos), con suero fetal bovino al 10% y la mezcla

de antibióticos y antimicóticos (Sigma). A continuación se prepararon dos disoluciones:

Disolución A: 149 μ l de tampón Hepes 50 mM y 3 μ l de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM.

Disolución B: 132 μ l de tampón TE (pH 8,0), 5 μ l del ADN plasmídico y 18,2 μ l de CaCl_2 2M.

La disolución B se añadió sobre la A produciéndose la formación del precipitado de fosfato cálcico con el ADN. La mezcla se dejó reposar 20 min y entonces se añadió 0,3 ml de esta solución a la placa de cultivo.

Las células se incubaron a 27°C durante 12-14 h y entonces se eliminó el medio y se añadió medio nuevo Sf-900 II (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos) y las células se dejaron en incubación a 27°C durante unas 48-72 h. Una vez pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante y se utilizó para infectar nuevas células con el fin de amplificar el virus.

La Figura II.18 muestra el esquema básico de la obtención del baculovirus recombinante.

2.3.2.2. Purificación de la proteína.

Se crecieron células de insecto *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Co., CA, Estados Unidos) en suspensión en 500 ml de medio de cultivo Sf-900 II (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos) a 27°C hasta que alcanzaron una concentración de 2×10^6 células/ml. Entonces, el cultivo fue infectado con un título alto del baculovirus recombinante (aproximadamente 5 pfu/célula) y se mantuvo a 27°C durante unas 48 h (hasta alcanzar una viabilidad celular de, aproximadamente, el 70%).

Pasado este tiempo, las células se recogieron y se centrifugaron a $4.500 \times g$ durante 15 min, desechándose el sobrenadante. El precipitado celular se sometió al proceso de purificación, que consistía en los siguientes pasos:

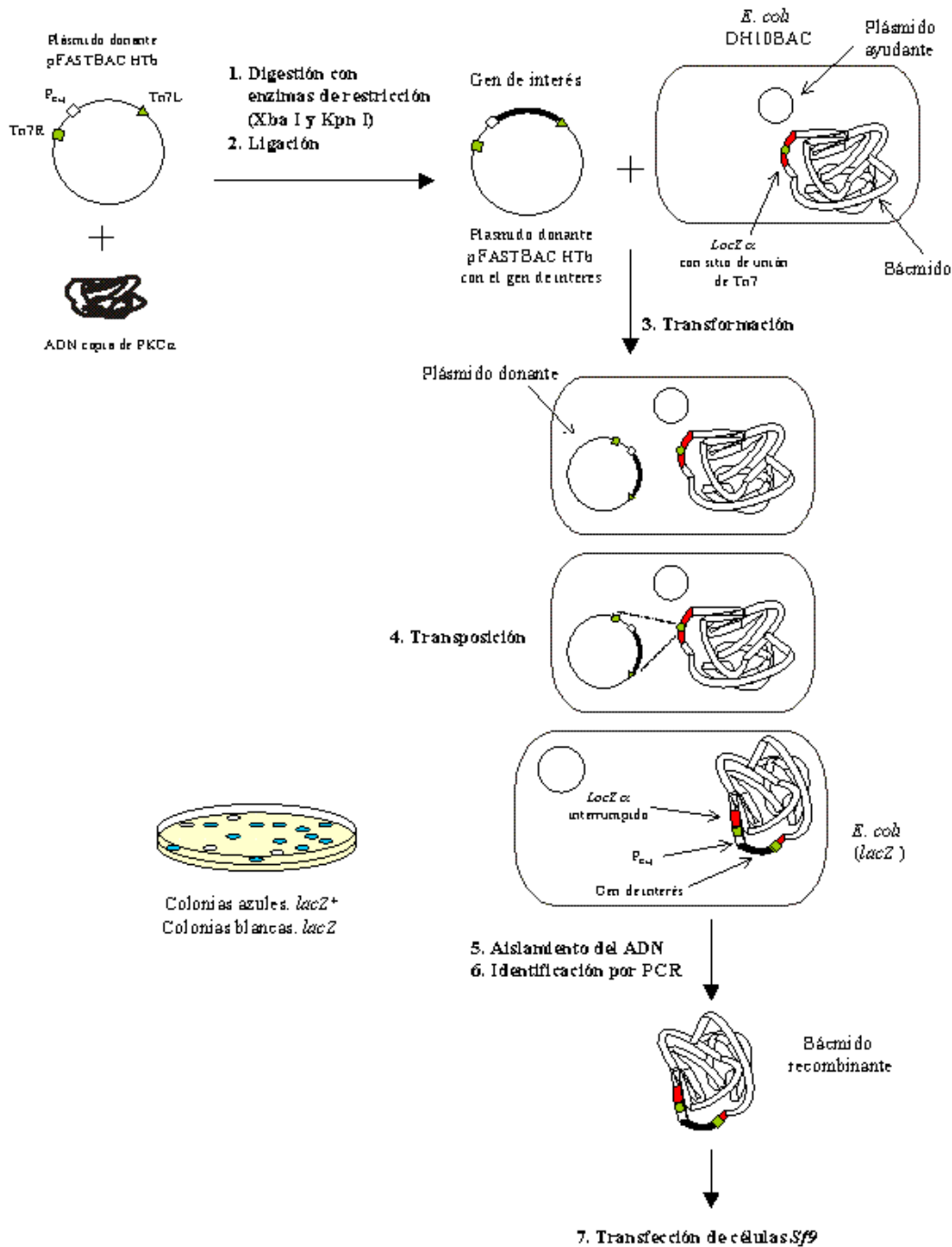


Figura II.18. Esquema básico de la obtención de un baculovirus recombinante. El gen de interés se incluye en el plásmido donante y queda bajo el control de un fuerte promotor y flanqueado por las secuencias del transposón Tn7. El plásmido donante se introduce en las bacterias *E. coli* DH10BAC, las cuales contienen un plásmido ayudante y un báculo receptor. Una vez introducido el plásmido donante, se produce la transposición mediante la cual el gen de interés es insertado en el báculo receptor, interrumpiendo el gen *LacZ* α gracias a la intervención de un plásmido ayudante. De esta forma, las bacterias donde se haya producido la recombinación se pueden seleccionar en presencia del reactivo Bluo-gal. Finalmente, el báculo recombinante se puede aislar y, tras identificar que contiene el gen de interés, se utilizará posteriormente para transfectar las células Sf9.

a) *Lisado de las células.* El precipitado celular se resuspendió en un tampón de homogenización (aproximadamente 5 ml tampón/g de células) que contenía Tris-HCl 25 mM pH 7,5, EGTA 100 μ M, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, glicerol al 10 % (v/v), β -octilglucósido 20 mM, benzamidina 10 mM, PMSF 1mM, leupeptina 10 μ g/ml y Na_3VO_4 100 μ M (todos estos reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, Estados Unidos). Las células se lisaron mediante ultrasonidos (10 ciclos \times 10 seg) y el homogeneizado resultante se centrifugó a 20.000 \times g durante 30 min a 4°C. Para optimizar la extracción de la proteína, el precipitado celular se volvió a procesar de igual manera.

b) *Incubación con resina de níquel.* La mezcla de lisados celulares se aplicaron en suspensión a 2 ml de resina Probond® (Invitrogen Co., CA, Estados Unidos), la cual había sido equilibrada previamente con tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 200 mM), y se dejó agitando suavemente en incubación durante 2 h a 4°C.

c) *Elución de las proteínas unidas.* A continuación la resina se lavó dos veces con 10 ml de tampón de lavado cada vez y otras dos veces con tampón de lavado junto con una pequeña cantidad de imidazol (Imidazol 20 mM) para eliminar una parte de las proteínas inespecíficas unidas. Seguidamente, la resina se cargó en una columna y se procedió a la elución de las proteínas que estaban unidas. La columna se sometió a un gradiente creciente de concentración de imidazol (4, 4 y 4 ml del mismo tampón, con imidazol 50, 300 y 500 mM, respectivamente) y se recogieron fracciones de aproximadamente 0,5 ml. La presencia de la PKC α se determinó mediante la tinción con azul de Coomassie de un gel de electroforesis desnaturalizante con SDS (SDS-PAGE, 12,5% gel separador) con alícuotas de las fracciones obtenidas.

d) *Dilución de Imidazol.* Las fracciones donde aparecía la PKC α se mezclaron y el imidazol presente se diluyó hasta valores inferiores a 20 mM, mediante intercambio con el tampón de lavado con EGTA 0,5 mM, EDTA 0,5 mM y DTT 0,5 mM (Sigma), utilizando unas unidades de filtración en centrifuga Ultrafree-30 (Millipore Corp. Bedford, MA, Estados Unidos).

e) *Columna de fenil-sefarosa.* A continuación, se añadió NaCl cuidadosamente a la mezcla de proteína diluida hasta obtener una concentración total de sal de 0,8 M.

Entonces, la mezcla se cargó en una columna de 5 ml de fenil-sefarosa (Sigma), previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,8 M, EGTA 0,5 mM, EDTA 0,5 mM y DTT 0,5 mM, a una velocidad de flujo de 0,4 ml/min. La proteína se eluyó en el mismo tampón con un gradiente lineal descendente de sal (NaCl 0,8-0 M), recogiendo fracciones de 0,8 ml. Para ello se utilizó el dispositivo Econo System (BioRad Laboratories, CA, Estados Unidos). La presencia de la proteína se detectó mediante tinción de plata de un gel de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, 12,5% gel separador).

f) *Corte del tallo de 6×His*. Las fracciones que contenían proteína se mezclaron y se incubaron con la proteasa recombinante rTEV (Invitrogen Co., CA, Estados Unidos), a una concentración aproximada de 0,1U/μg proteína, durante 4 h, a 25°C, en agitación, para eliminar el tallo de seis His. Se tomaron muestras a diferentes tiempos para comprobar que el corte había sido completo mediante tinción con azul de Coomassie de un gel de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, 12,5% gel separador). A continuación, la mezcla se incubó con 30 μl de resina Probond® para eliminar así la proteasa y los restos de los tallos de 6×His. La proteína se concentró hasta 1 ml aproximadamente, utilizando de nuevo una unidad de filtración Ultrafree-30 (Millipore Corp. Bedford, MA, Estados Unidos).

g) *Columna de Macro-Prep®*. La mezcla se aplicó manualmente sobre un cartucho de intercambio iónico de alta capacidad Econo-Pac® Q (BioRad), previamente activado, y las proteínas se eluyeron en el mismo tampón con un gradiente de sal lineal ascendente (50 mM-1 M), recogiendo fracciones de 0,5 ml. Se utilizó de nuevo el dispositivo Econo System de BioRad (BioRad Laboratories, CA, Estados Unidos). La presencia de la proteína se detectó mediante tinción de plata de un gel de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, 12,5% gel separador).

La mezcla final de PKCα era altamente pura, como se verificó en un gel de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, 12,5% gel separador) teñido con plata. La proteína se concentró utilizando de nuevo una unidad de filtración Ultrafree-30 (Millipore Corp. Bedford, MA, Estados Unidos) y se conservó a -80°C en presencia de glicerol al 10% (v/v) y Triton X-100 al 0,05% (Sigma). La Figura II.19 muestra el esquema general de la purificación de la PKCα a partir de células de insecto Sf9.

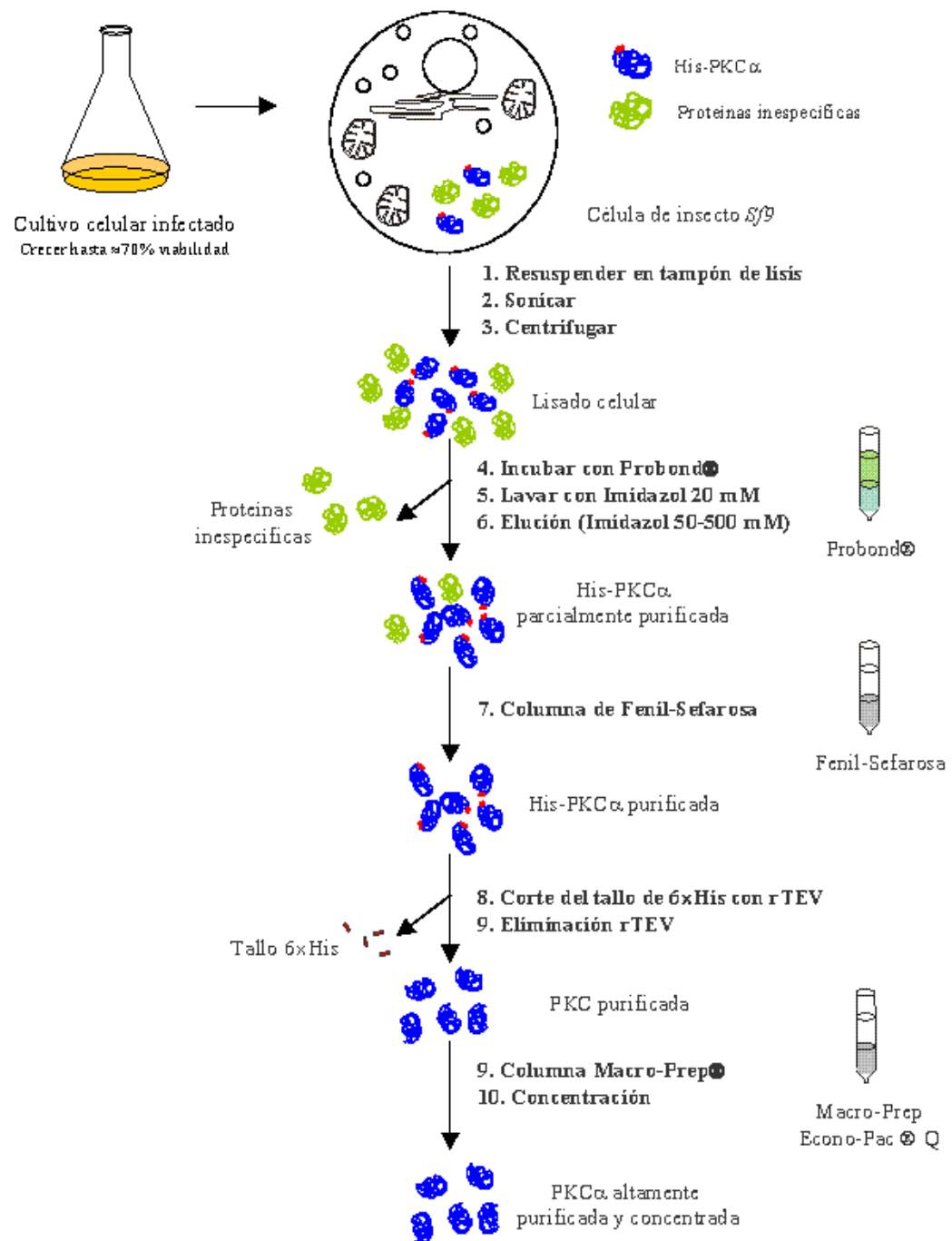


Figura II.19 Esquema de la purificación de PKC α completa en células de insecto. Tras incubación de un cultivo de células Sf9 infectado con el baculovirus recombinante durante unas 48 h, las células se recogieron y lisaron. Después de eliminar el material insoluble por centrifugación, el lisado celular se incubó con la resina Probond®, de alta afinidad por el tallo seis His. El lavado de la resina con imidazol 20 mM permitió eliminar gran parte de las proteínas inespecíficas y, después, la proteína de fusión se eluyó con imidazol 50-500 mM. La suspensión se pasó a través de una columna de Fenil-Sefarosa, con un gradiente decreciente de sal (0,8 - 0 M NaCl). Las fracciones de interés se incubaron con la proteasa rTEV para eliminar el tallo de seis His. Finalmente, se utilizó una columna Macro-Prep Econo-Pac® Q con un gradiente creciente de sal (50 mM - 1 M NaCl) para terminar la purificación y la proteína se concentró en un filtro de centrifuga.

2.4. Determinación de la concentración de proteína.

Para determinar la concentración de proteína se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA) descrito por Smith y col. (1985). En este ensayo se emplearon los siguientes reactivos:

- *Albumina de suero bovino* (BSA) 0,1 mg/ml (utilizada como proteína patrón).

- *Reactivo A*. Contiene bicinconinato sódico (BCA) al 1% (p/v), Na_2CO_3 al 2% (p/v), tartrato sódico al 0,16% (p/v), NaOH al 0,4% (p/v) y NaHCO_3 al 0,95% (p/v) en agua destilada (pH 11,25, ajustado con NaOH 10 M).

- *Reactivo B*. Contiene $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 4% (p/v) en agua destilada.

Antes del ensayo se mezclaron los reactivos A y B en una proporción 50:1 (v/v). Para el ensayo se preparó una serie de tubos con cantidades conocidas de BSA (0, 2, 5, 7, 10 y 15 μg), con los que se confeccionó una recta patrón, y otra serie de tubos con la proteína problema, de concentración desconocida. A todos los tubos se les añadió 0,5 ml de reactivo mezcla y se incubaron durante 30 min a 60°C. Finalmente se dejaron enfriar y se les midió su absorbancia a 562 nm.

2.5. Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con la presencia de SDS (SDS-PAGE), siguiendo el método desarrollado por Laemmli (1970). El sistema utilizado para la electroforesis fue el Mini-Protean III (BioRad Laboratories, CA, Estados Unidos). En cada electroforesis se utilizaron dos tipos de gel (minigeles). Primero se formó el llamado *gel separador*, donde las muestras se separan en función de su carga y tamaño. En el caso de los dominios C2 de PKC clásicas para el gel separador se utilizó una mezcla de acrilamida-bisacrilamida (Sigma) al 15% (p/v), disuelta en tampón Tris-HCl 0,375 M pH 8,8 y SDS 0,1% (p/v) (Sigma), mientras que cuando se analizaba PKC α completa la mezcla fue del 12,5% (p/v). Para polimerizar el gel se añadió persulfato amónico (PSA) al 0,064% (p/v) y TEMED 0,064% (v/v) (Sigma). Una vez polimerizado el gel

separador, se añadió sobre el mismo el *gel concentrador*, que contenía una mezcla de acrilamida-bisacrilamida al 5% (p/v), disuelta en tampón Tris-HCl 0,130 M pH 6,8 y SDS 0,1% (p/v), con PSA 0,1% (p/v) y TEMED 0,1% (v/v) como agentes polimerizantes. Como su nombre indica, el gel concentrador se utiliza para conseguir reunir las proteínas para que penetren al mismo tiempo en el gel separador.

Antes de aplicar las muestras sobre el gel, éstas se disolvieron en Tris-HCl 40 mM pH 6,8, DTT 50 mM (Sigma), SDS 1% (p/v), glicerol 7,5% (v/v) y azul de bromofenol 0,003% (p/v) (Merck). Como tampón del electrodo se utilizó Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y SDS 0,1% (p/v). Una vez cargadas las muestras en los geles, éstos se sometieron a un voltaje de 90 V hasta que el frente pasó el gel concentrador y a 150-160 V mientras el frente estaba en el gel separador.

2.6. Tinción de los geles de electroforesis.

2.6.1. Tinción de plata.

Para la tinción de plata de los geles de electroforesis se utilizó el método comercial suministrado por Bio-Rad Laboratories (CA, Estados Unidos).

Los geles se fijaron durante 20 min en una disolución que contenía metanol al 50% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y glicerol al 2,5% (v/v). Después de lavar los geles dos veces con agua bidestilada, 10 min cada vez, éstos se tificaron con una disolución que contenía AgNO_3 al 0,1% (p/v), NH_4NO_3 al 0,1% (p/v), ácido wolfrámico-silícico al 0,5% (p/v), formaldehído al 0,14% (v/v) y Na_2CO_3 2,5% (p/v).

La tinción se detuvo con una disolución de ácido acético al 5% (v/v).

2.6.2. Tinción con azul de Coomassie.

Para la tinción con azul de Coomassie, los geles de electroforesis se incubaron en una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0,1% (p/v) en metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 20 min. A continuación se destiñó con una disolución de metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

2.7. Electrotransferencia.

Para realizar la transferencia de las proteínas desde los geles de electroforesis hasta una membrana de nitrocelulosa (PROTRAN, Schleicher & Schuell Inc., Estados Unidos), se utilizó el sistema Trans-Blot Semi Dry Transfer Cell de BioRad (BioRad Laboratories, CA, Estados Unidos).

Una vez realizada la electroforesis, los geles y las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante 15 min con el tampón Tris-HCl 48 mM pH 8,3, glicina 39 mM, metanol al 20% (v/v) y SDS al 0,0375% (p/v) frío. A continuación, los geles se colocaron sobre las membranas en este dispositivo y la transferencia se realizó durante 20 min a 15 V.

Finalizada la transferencia, los geles se desecharon y las membranas se incubaron con la disolución de bloqueo, compuesta de BSA al 2% (p/v) en tampón TBST, durante 2 h, a temperatura ambiente y con agitación suave. El tampón TBST contenía Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y 0,1% (v/v) de Tween-20 (Sigma). Después de esto, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante 2-3h a temperatura ambiente (o durante toda la noche a 4°C), lavándose a continuación con tampón TBST tres veces durante 10 min cada una para eliminar el anticuerpo unido inespecíficamente. A continuación, las membranas se incubaron de nuevo con disolución de bloqueo durante 30 min y, después, con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 45 min, con agitación suave. Pasado este tiempo, las membranas se lavaron tres veces con tampón TBST, durante 10 min cada vez, para eliminar los restos del anticuerpo.

El revelado de la actividad peroxidasa se realizó en oscuridad añadiendo el sustrato de dicha enzima, incluido en el reactivo de quimioluminiscencia (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer, NEN, Boston, MA, Estados Unidos). El producto de la reacción de la peroxidasa emitía luz capaz de impresionar una película fotográfica. Así, la membrana se incubó durante un minuto con el reactivo de quimioluminiscencia y, a continuación, se enfrentó a una película fotográfica durante distintos tiempos (1, 2 y 5 min). El revelado de la película permitió identificar y cuantificar las bandas de las proteínas.

2.8. Determinación de la concentración de lípidos.

2.8.1. Determinación de la concentración de fosfolípido.

Para determinar la concentración de fosfolípido se utilizó el método descrito por Bötcher y col. (1961), el cual se basa en hidrolizar la mezcla fosfolipídica y medir la concentración de fosfato inorgánico (Pi) liberado, el cual aparece en proporción estequiométrica 1:1 con respecto a cada molécula de fosfolípido.

La recta patrón de Pi se confeccionó a partir de una disolución estándar de Na_2HPO_4 0,4 mM, de la que se añadieron 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 160 nmoles a cada tubo. En los tubos problema se añadieron unos 80 nmoles aproximadamente. A continuación, a cada tubo se le añadió 0,4 ml de HClO_4 al 60% (v/v) y todos se incubaron a 180-190°C durante 30 min en un baño de arena. Posteriormente se añadió a cada tubo 4 ml de reactivo de molibdato, el cual contenía 2,2 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (Merck) y 14,3 ml de H_2SO_4 concentrado por litro de disolución. Después de agitar bien los tubos, se les añadió a cada uno 0,5 ml de ácido ascórbico al 10% (p/v) (Merck), mientras se sometían a agitación. Posteriormente, las muestras se incubaron a 100°C durante 10 min y, finalmente, se dejaron enfriar y se midió su absorbancia a 812 nm.

2.8.2. Determinación de la concentración de diacilglicerol

La concentración de diacilglicerol se calculó mediante cromatografía de gases, tras la metilación de sus ácidos grasos. El procedimiento se basa en el protocolo propuesto por Kuksis y col. (1975; 1978).

Básicamente, el diacilglicerol se evaporó y secó, junto a distintos patrones de ácidos grasos de diferente longitud de cadena de concentración conocida, bajo una corriente de N_2 . A continuación, se añadieron 2 ml de H_2SO_4 al 5% (v/v) en metanol a cada tubo y se agitaron. Entonces, las muestras se incubaron durante 1 h a 100°C en un baño de arena. Seguidamente, se añadieron 5 ml de agua y 3 ml de hexano. Los tubos se agitaron fuertemente y después se centrifugaron en una centrifuga de mesa durante 5 min para separar las dos fases. Los ácidos grasos metilados quedaron en la fase orgánica, la cual se recogió y se pasó a un tubo nuevo. Se volvió a repetir la extracción de la fase acuosa añadiendo de nuevo otros 3 ml de hexano. Las dos fases

orgánicas obtenidas se juntaron y se les añadió una pequeña cantidad de Na_2SO_4 anhidro para eliminar los posibles restos de agua. Tras eliminar el Na_2SO_4 anhidro mediante centrifugación, se evaporó totalmente el hexano. La muestra así metilada se resuspendió en 50 μl de hexano y se inyectó en el cromatógrafo de gases (GC-Mini 3, Shimadzu Co., Kyoto, Japón). La concentración de la muestra de diacilglicerol problema se determinó mediante la comparación del área obtenida del pico de su ácido graso correspondiente, con el área del patrón de concentración conocida.

2.9. Preparación de vesículas fosfolipídicas.

2.9.1. Vesículas multilamelares (MLV).

Todos los lípidos (fosfolípidos y diacilgliceroles) se conservaron disueltos en cloroformo o cloroformo/metanol 2:1 (v/v) a -40°C . Los lípidos se mezclaron a las proporciones deseadas y se secaron bajo una atmósfera de N_2 . Las últimas trazas de disolvente orgánico se eliminaron sometiendo las muestras a vacío durante al menos 2 h. Después los lípidos secos se resuspendieron en el tampón correspondiente mediante agitación fuerte e incubación a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase durante, al menos, 15 min. De esta forma se constituyeron las vesículas multilamelares.

2.9.2. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

Previamente se prepararon vesículas multilamelares como se ha descrito en el apartado anterior, y entonces las mezclas se sometieron a ultrasonidos utilizando un homogeneizador de ultrasonidos o sonicador de tipo punta (Cole-Parmer Instrument, Co., Chicago) hasta conseguir una mezcla clara. Durante este proceso, las muestras se conservaron bajo una atmósfera de N_2 . Después, las muestras se centrifugaron a $13.000\times g$ durante 30 min para separar las posibles MLV que quedasen y eliminar las partículas de titanio desprendidas del sonicador.

2.9.3. Vesículas unilamelares grandes (LUV).

Las vesículas unilamelares grandes se obtuvieron por extrusión siguiendo el protocolo propuesto por Rebecchi y col. (1992). Las mezclas lipídicas se resuspendieron en el tampón adecuado para formar las vesículas multilamelares

grandes como anteriormente se ha comentado. Tras someter las mezclas a un proceso de congelación y descongelación a 30°C, se hicieron pasar a presión diez veces a través de dos filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 0,1 µm utilizando un sistema Extruder (Lipex Biomembranes Inc., Canadá). La concentración del fosfolípido extruído se calculó mediante el procedimiento anteriormente citado.

2.9.4. Micelas de Triton X-100.

Los lípidos se mezclaron en las proporciones adecuadas y, a continuación, se evaporaron y secaron como se describió para el caso de las MLV. Entonces, las mezclas lipídicas se solubilizaron en el volumen adecuado de Triton X-100 al 3% (v/v) mediante agitación e incubación a 37°C durante 5 min.

2.10. Determinación de la actividad quinasa.

La actividad quinasa de la PKC α se analizó como se ha descrito previamente (Hannun y col., 1985), con algunas modificaciones. Básicamente se trata de cuantificar la incorporación de fosfato marcado radiactivamente [γ - 32 P] a una molécula sustrato de la proteína (es este caso, Histona III-S).

Para medir esta actividad quinasa, es necesario añadir a las muestras de reacción los activadores de la proteína: calcio, fosfolípidos aniónicos y/o diacilglicerol o ésteres de forbol. Se pueden utilizar las mezclas lipídicas tanto en forma de vesículas multilamelares grandes como en forma micelas. En los casos de vesículas multilamelares grandes, se prepararon mezclas lipídicas con una cantidad de fosfolípido total de 4,8 mM (de una mezcla de 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) y 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, Estados Unidos), por ejemplo) y la correspondiente proporción de diacilglicerol. Las micelas mixtas, compuestas, por ejemplo, por 10 mol% de 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) y 1,5 mol% de 1,2-dioleil-glicerol (DOG) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, Estados Unidos) se prepararon en Triton X-100 al 3% (v/v) (Sigma). Una muestra de 25 µl de estas mezclas lipídicas (vesículas o micelas) se añadió a la mezcla de reacción (volumen total final 250 µl), la cual estaba compuesta por Tris-HCl 20 mM pH 7,5, Histona III-

S 0,2 mg/ml (Sigma), [γ - ^{32}P] ATP 20 μM (300.000 cpm/nmol) (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA, Estados Unidos), MgCl_2 5 mM y CaCl_2 200 μM (Merck).

La reacción se inició con la adición de una alícuota (10 μl) de proteína y se detuvo, después de incubar las muestras durante 10 min a 25°C, mediante la adición de 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 25% (p/v) frío (Acros, New Jersey, Estados Unidos) y 1 ml de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,05% (p/v) fría (Sigma), en este orden.

Después de permitir la precipitación de las proteínas en hielo durante 30 min, las muestras se sometieron a filtración utilizando unos filtros de fibra de vidrio de 2,5 cm de diámetro (Sartorius, Göttingen, Alemania), los cuales se lavaron tres veces con 5 ml de TCA al 10% (p/v) cada vez. La incorporación de ^{32}P a la histona se midió en un contador de centelleo líquido. La actividad basal se midió en presencia de EGTA 5 mM y en ausencia de lípidos y Ca^{2+} .

2.11. Ensayos de enlace a fosfolípido.

2.11.1. Ensayos de enlace a vesículas multilamelares.

Se prepararon vesículas multilamelares como se ha descrito anteriormente, incluyendo 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfolina (POPC) y 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfo-L-serina (POPS), a una proporción molar 4:1 (POPC:POPS), con ionóforo A23187 (a una relación molar fosfolípido/ionóforo de 1000:1), y diferentes proporciones de 1,2-dipalmitil-*sn*-glicerol (DPG) y 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicerol (POG). Las mezclas lipídicas se resuspendieron en el tampón que contenía Tris-HCl 20 mM pH 7.5, CaCl_2 200 μM y MgCl_2 5 mM.

Una mezcla de 25 μL de lípidos a una concentración final de 480 μM se añadió a cada tubo de reacción. El volumen final de reacción fue de 250 μL . La mezcla de ensayo se incubó durante 10 min a la temperatura deseada antes de añadir la proteína. En el caso de la PKC α , se añadió 0.1 μg de proteína del lisado celular, mientras que para el dominio C2 de PKC α se añadió 0.5 μg de proteína purificada.

El ensayo de unión acabó después de incubar las muestras durante 20 min a la temperatura deseada (27°C para las mezclas con DPG y 32°C para las mezclas con POG). Entonces la proteína unida a las vesículas se separó de la libre mediante centrifugación a 15000×g durante 45 min a la temperatura de unión. La proteína libre quedó en los sobrenadantes de las muestras, mientras que la proteína unida precipitó junto con las mezclas lipídicas. Se llevaron a cabo experimentos de control para descartar las interferencias de las proteínas del lisado celular utilizando PKC α tipo silvestre expresada en un baculovirus recombinante y altamente purificada de células de insecto. Asimismo, se realizaron controles en ausencia de lípidos para descartar posibles efectos de precipitación de las proteínas.

La cantidad de PKC α unida a los lípidos se determinó mediante densitometría de las bandas obtenidas tras someter las muestras a electroforesis en gel desnaturante con SDS (SDS-PAGE con un gel separador al 12,5 %), electrotransferencia e inmunoanálisis del epítipo HA. La cantidad de proteína cargada en el gel se encontró dentro del rango de linealidad de detección del sistema de quimioluminiscencia.

La cantidad del dominio C2 de PKC α se determinó mediante densitometría tras la tinción de plata de un gel desnaturante con SDS (SDS-PAGE con un gel separador al 15 %) donde se habían cargado alícuotas de las diferentes muestras.

2.11.2. Ensayos de enlace de PKC α a vesículas unilamelares grandes cargadas con sacarosa.

El enlace de PKC α a vesículas fosfolipídicas se estudió sirviéndonos de la capacidad de las vesículas unilamelares grandes cargadas con sacarosa de sedimentar cuando se someten a ultracentrifugación. Se prepararon vesículas unilamelares grandes cargadas con sacarosa como se ha descrito anteriormente, incluyendo 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfolina (POPC) y 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfato (POPA), a una proporción molar 1:4 (POPC:POPA). El tampón de resuspensión de las vesículas contenía Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, sacarosa 0,25 M y DTT 1mM.

Se utilizaron 50 μg de PKC α y 250 μg de mezcla lipídica en cada reacción, utilizando como tampón de reacción el mismo citado anteriormente. El volumen final de cada reacción fue de 200 μL . Los experimentos se llevaron a cabo utilizando diferentes cantidades de Ca^{2+} libre. La relación molar (proteína:fosfolípido:calcio) utilizada en estos ensayos fue la misma que la usada en los experimentos de FT-IR. Se llevaron a cabo dos controles, uno donde no se incluyeron vesículas ni calcio (para descartar la posible precipitación de la proteína) y otro donde se añadieron vesículas en ausencia de calcio. La mezcla se incubó a 25°C durante 10 min antes de añadir la proteína y el ensayo terminó 20 min después. La proteína unida a las vesículas fue separada de la proteína libre mediante ultracentrifugación a 100.000 \times g durante 60 min a 15°C.

La proteína PKC α unida a los lípidos se determinó mediante densitometría de las bandas obtenidas tras someter las muestras a electroforesis en gel desnaturante con SDS (SDS-PAGE, con un gel separador al 12,5 %), electrotransferencia e inmunoanálisis utilizando un anticuerpo específico de PKC α . La cantidad de proteína cargada en el gel se encontró dentro del rango de linealidad de detección del sistema de quimioluminiscencia.

2.12. Ensayos de filtración en gel con los dominios C2 de las PKCs clásicas.

Estos ensayos se realizaron siguiendo el método descrito por García-García y col. (1999). Se prepararon vesículas unilamelares pequeñas como se ha descrito anteriormente, incluyendo 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfolina (POPC) y 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfato (POPA), a una proporción molar 1:4 (POPC/POPA) y trazas de 1,2-dipalmitil-L-3-fosfatidil[N-metil- ^3H]colina, a una concentración aproximada de 3000-6000 cpm/mg de fosfolípido. El tampón de resuspensión de las vesículas contenía Hepes 25 mM pH 7.4, NaCl 100 mM y CaCl_2 0,2 mM para el dominio C2 de la PKC α , MOPS 20 mM pH 6.8, NaCl 100 mM y CaCl_2 0,2 mM para el dominio C2 de la PKC β II; y Tris-HCl 25 mM pH 8.0, NaCl 100 mM y CaCl_2 0,2 mM para el dominio C2 de la PKC γ .

Las diferentes muestras contenían 80 μg del dominio C2 de PKC clásicas y 400 μg de vesículas fosfolípicas marcadas con [^3H] y se preincubaron en 100 μL del tampón correspondiente durante 10 min. El tampón utilizado en cada caso fue el

mismo que el citado anteriormente para la formación de las vesículas. La relación molar (proteína:fosfolípidos:calcio) fue la misma que la utilizada en los ensayos de FT-IR. Las muestras se aplicaron a una columna con Sephadex G-100 (Sigma) (1,0 cm × 2,5 cm) equilibrada con el mismo tampón. Las proteínas se eluyeron utilizando los tampones correspondientes y se recogieron fracciones de 100 μ L. El perfil de elución de las mezclas fosfolípicas se determinó midiendo la radiactividad contenida en cada fracción. Por su parte, el perfil de elución de cada dominio C2 se determinó mediante densitometría utilizando la tinción de plata sobre un gel de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE, con un gel separador al 15 %) donde se cargaron alícuotas de cada fracción. Se realizó un ensayo control donde se obtuvo el perfil de elución de las proteínas en ausencia de vesículas.

Capítulo III

Activación de la PKC α mediante diferentes proporciones de diacilgliceroles.

1. RESUMEN.

Se estudió la activación de la PKC α utilizando como modelo de membrana una mezcla de POPC/POPS (relación molar 4:1) y diferentes proporciones de los diacilgliceroles DPG o POG. Las mezclas lipídicas que contenían DPG se estudiaron y caracterizaron utilizando diferentes técnicas biofísicas y se construyó el diagrama de fases del sistema. Este diagrama de fases mostró tres regiones delimitadas por dos compuestos: el compuesto 1 (CO1), con 35 mol % de DPG, y el compuesto 2 (CO2), con 65 mol % de DPG. La activación de la PKC α con concentraciones crecientes de DPG aumentó hasta alcanzar un máximo a 30 mol % de DPG, y a partir de entonces se observó un descenso de la misma. La actividad máxima apareció a las concentraciones de DPG correspondientes a la transición de la región I a la región II del diagrama de fases. Se observaron resultados similares cuando el enzima se activó utilizando POG, alcanzándose entonces el máximo con 10 mol % de POG. Este máximo se mantuvo prácticamente constante hasta 50 mol % de POG, a partir del cual comenzó a descender. Es interesante destacar el hecho de que la proteína se unió a la membrana de forma constante y máxima a todas las concentraciones de DPG y POG utilizadas.

Estos resultados inesperados se atribuyeron a la interacción del dominio C2 de la proteína con las moléculas de POPS de las membranas y con los iones calcio presentes, lo cual se confirmó mediante la utilización del dominio C2 de PKC α aislado, comprobándose que permanecía unido máximamente con todas las concentraciones de DPG y POG utilizadas. También se utilizó el mutante D246/248N de la PKC α , el cual tiene disminuida la capacidad de enlazar calcio a través del dominio C2. Este mutante D246/248N no se activó ni se unió a membranas mediante concentraciones crecientes de DPG. Sin embargo, el POG sí fue capaz de activar a este mutante, mostrando una dependencia similar tanto la actividad como el enlace a membranas. Estos datos destacan la importancia de la insaturación de una de las cadenas de los ácidos grasos del diacilglicerol para la interacción con la PKC α .

2. INTRODUCCIÓN.

Existe una gran cantidad de información que sugiere que la estructura de la membrana está modulada por la presencia de diacilgliceroles. Así, se ha demostrado que los diacilgliceroles producen cambios estructurales en la membrana, como por ejemplo la separación lateral de fases (Ortiz y col., 1988; De Boeck y col., 1989; Heimburg y col., 1992; López-García y col., 1994a; Goldberg y col., 1994; Dibble y col., 1996), la formación de fases sin bicapa (De Boek y col., 1989; Heimburg y col., 1992; Das y Rand, 1986; Cheng y col., 1986; López-García y col., 1994b) y la deshidratación de la interfase de la membrana (López-García y col., 1994b, López-García y col., 1993). Es significativo el hecho de que la deshidratación producida por los diacilgliceroles en la membrana tiene un efecto mayor y más drástico sobre la fosfatidilserina que sobre la fosfatidilcolina (López-García y col., 1994b), lo cual puede facilitar la fusión de membranas (Siegel y col., 1989; Ortiz y col., 1992; Nieva y col., 1989; Van Gorkom y col., 1992; Sánchez-Migallón y col., 1995; Villar y col., 2001) y quizás también puede activar no sólo a la PKC sino a otras enzimas como las fosfolipasas (Villar y col., 2001; Dawson y col., 1983; Roldan y Fragis, 1994; Zidovezki y col., 1992), la fosfatidilcolina citidil transferasa (CTP) (Arnold y Cornell, 1996a) y las tirosín quinasa (Arnold y Newton, 1996b).

Por otro lado, se han propuesto muchas hipótesis acerca de la modulación de la actividad de la PKC por diacilgliceroles. Una de estas hipótesis sugiere que la actividad de la PKC aumenta con la tendencia de los lípidos a formar fases sin bicapa, como podría ser el caso de las regiones de la membrana con alta curvatura producida por moléculas, como los diacilgliceroles o las fosfatidiletanolaminas, que tienen pequeños grupos de cabeza polares (Goldberg y col., 1994; Das y Rand, 1986; Epanand y Bottega, 1985; Epanand y col., 1988). También se ha sugerido que la presencia de diacilgliceroles aumenta el espaciamiento entre los grupos de cabeza de los fosfolípidos debido al intercalado de los pequeños grupos de los diacilgliceroles (Das y Rand, 1986; Cunningham y col., 1989; Epanand, 1987; Bolen y Sando, 1992; Slater y col., 1994). Podría ser posible también que el efecto de deshidratación de la superficie de la membrana inducido por los diacilgliceroles pudiera facilitar la

inmersión de la proteína en la membrana (López-García y col., 1993). Recientemente, se ha propuesto que la heterogeneidad de la membrana, incluyendo la coexistencia de fases ricas y pobres en diacilglicerol, puede contribuir a la activación de la PKC (Dibble y col., 1996; Hinderliter y col., 1997) y, de forma similar, que la configuración estructural de la membrana correspondiente a la mezcla del complejo 1,2-DMG/fosfolípido y fosfolípido libre es capaz de explicar mejor la actividad de la PKC α que el complejo 1,2-DMG/fosfolípido sólo (Micol y col., 1999).

Existen varios trabajos que indican que la actividad de la PKC está modulada por otras propiedades estructurales de la membrana (Bolen y Sando, 1992; Epanand y Lester, 1990; Stubbs y Salter, 1996). Así, por ejemplo, se ha demostrado que la actividad de la PKC es sensible a las insaturaciones de las cadenas acílicas (Bolen y Sando, 1992), probablemente debido a alteraciones en el espaciamiento de los grupos de cabeza (Bolen y Sando, 1992; Slater y col., 1994). La actividad de la PKC es sensible también a la fosfatidiletanolamina, y esto se ha atribuido a la tendencia de dicho fosfolípido a alterar la estructura de bicapa de la membrana (Mosior y col., 1996; Senisterra y Epanand, 1993). Recientemente se ha demostrado que el estado físico de la membrana afecta a la actividad enzimática y a la energía de activación de la PKC α (Jiménez-Monreal y col., 1999).

Este trabajo describe el estudio sobre la activación de la PKC α mediante sistemas lipídicos compuestos por POPC/POPS (a una relación molar 4:1) con cantidades variables de dos diacilglicerol (DPG o POG), cuya principal diferencia es el grado de saturación de sus cadenas acílicas. La mezcla de fosfolípidos compuesta por POPC/POPS se suele tomar como modelo de membrana biológica en numerosos trabajos (Jiménez-Monreal y col., 1999; Sánchez-Piñera y col., 1999a). Los dos diacilglicerol utilizados están relacionados entre sí y con la mezcla fosfolipídica anterior (todos comparten la presencia de ácido palmítico). El DPG posee ácido palmítico como ácido graso y se tomó como ejemplo de diacilglicerol saturado puro, mientras que el POG contiene ácido palmítico y ácido oleico como ácidos grasos y se tomó como ejemplo de diacilglicerol insaturado.

También se muestra que cuando la PKC α es activada por la incorporación de DPG, la máxima activación se alcanza con 30 mol % de DPG, una concentración a la cual se encuentra presente el complejo CO1 puro (fosfolípido/diacilglicerol), como define el diagrama de fases. De cualquier modo, PKC α estaba unida de forma máxima a todas las concentraciones de DPG, e incluso en su ausencia. Por otro lado, el POG activó a la PKC α a un nivel máximo entre 20 - 50 mol % de POG, estando la enzima unida máximamente a todas las concentraciones. Mediante la utilización del dominio C2 aislado y el doble mutante D246/248N, mostramos que la PKC α puede ser activada a través del dominio C1 en presencia del POG pero no en presencia del DPG, demostrando así la importancia de una cadena insaturada de ácido graso en la molécula de diacilglicerol.

3. RESULTADOS.

3.1. Estudios térmicos de las mezclas lipídicas.

Se utilizó la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para estudiar el estado físico de las mezcla lipídicas usadas para activar la PKC α . Estas mezclas lipídicas analizadas estaban constituidas por POPC/POPS (a una relación molar de 4:1), ionóforo A23187 y cantidades crecientes de 1,2-*sn*-DPG, en presencia de 200 μ M CaCl $_2$ y 5 mM MgCl $_2$. En el ensayo de actividad enzimática de la PKC α se utilizaron las mismas concentraciones de estos cationes.

La Figura III.1 muestra los termogramas recogidos de las muestras analizadas. La muestra que contenía la mezcla de fosfolípidos puros (POPC/POPS en ausencia de DPG) presentó un pico de transición con una temperatura de inicio de -3°C. Este pico no fue muy cooperativo, como era de esperar debido al efecto del Ca $^{2+}$ y Mg $^{2+}$ sobre la POPS (López-García y col., 1994b; Micol y col., 1999). Además, se observó que este pico estaba dividido en dos partes, indicando una separación de fase de ambos fosfolípidos en presencia de estos cationes.

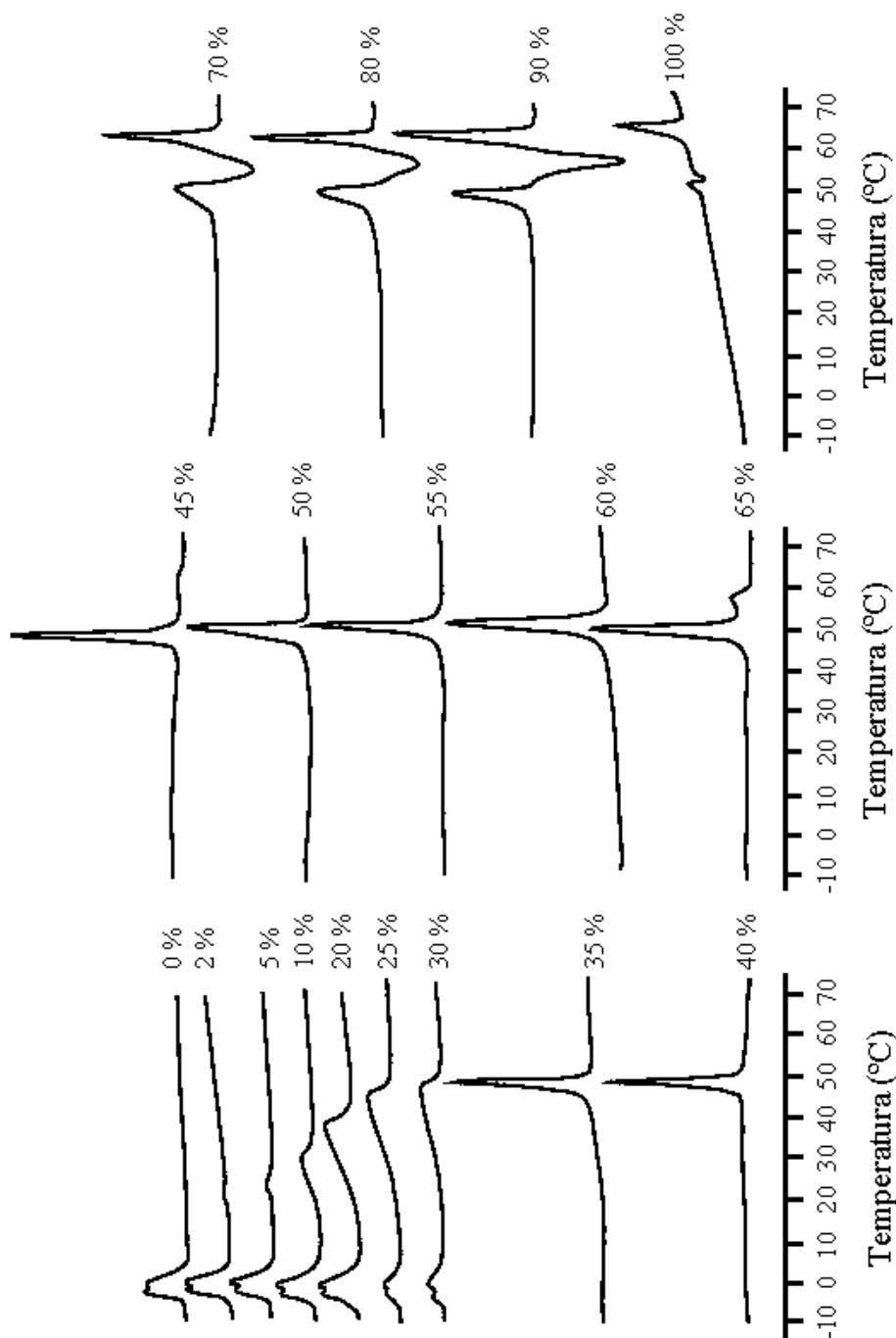


Figura III.1. Termogramas de los calentamientos de la mezcla POPC/POPS/DPG utilizada. Se prepararon MLVs con POPC/POPS a una relación molar 4:1, ionóforo A23187 y diferentes cantidades de 1,2-*sn*-DPG en presencia de CaCl₂ 200 μ M y MgCl₂ 5 mM. Se prepararon 2 μ moles de la mezcla de fosfolípidos con la correspondiente cantidad de 1,2-*sn*-DPG. Los termogramas se recogieron en un calorímetro Perkin-Elmer (Norwalk, CT) DSC-4 usando como referencia el mismo tampón de resuspensión. Las muestras se analizaron en un rango de temperaturas entre -12°C y 74°C, con una velocidad de calentamiento de 4°C/min y una sensibilidad de 1 mcal/s. Los barridos se repitieron hasta obtener perfiles idénticos. Se muestra el cuarto barrido de calentamiento de cada muestra. Las proporciones molares de DPG se indican a la derecha de cada termograma.

La adición de tan sólo 2 mol % de DPG produjo un efecto muy claro, dando lugar a la aparición de una nueva transición, muy pequeña y centrada en 21°C, junto con la primera transición a la misma temperatura que la de la mezcla inicial de fosfolípidos.

En la muestra de 5 mol % de DPG se observa un patrón muy similar al de la muestra anterior de 2 mol % de DPG, con dos transiciones, un pico a 24°C y otro a la misma temperatura que la mezcla de fosfolípidos puros.

Las muestras con 10, 20, 25 y 30 mol % de DPG presentaron un patrón muy similar al descrito anteriormente, aunque destaca el hecho de que el pico que aparece a la misma temperatura que la muestra de fosfolípido puro (-3°C) disminuyó de tamaño y la segunda transición se desplazó hacia temperaturas más altas conforme aumentaba la cantidad de DPG presente. En este sentido, el segundo pico se localizó a 30, 37, 42 y 45°C para las muestras de 10, 20, 25 y 30 mol % de DPG respectivamente.

La muestra de 35 mol % de DPG ya no presentó la transición debida al fosfolípido puro y el único pico detectado apareció a 49°C.

Se observaron unas transiciones muy similares con las muestras preparadas entre 40 y 60 mol % de DPG. Los perfiles cambiaron a 65 mol % de DPG, ya que se observó la aparición de una pequeña transición a una temperatura ligeramente superior a la de la transición principal situada a 49°C.

La muestra preparada con 70 mol % de DPG presentó un patrón completamente diferente, con la aparición de una segunda transición a mayor temperatura, que debe corresponderse con la separación de DPG libre. Así, una transición endotérmica a 49°C precede a una exotérmica y otra endotérmica situada en 66°C. La separación de fase del exceso de DPG comenzó a 65 mol % DPG, como indica el pequeño pico adicional observado.

Se observó el mismo patrón en las muestras con 80 y 90 mol % DPG, indicando la presencia de DPG puro. Se ha descrito que los diacilgliceroles puros pueden producir este tipo de comportamiento, incluso cuando se mezclan con

fosfolípidos (Heimburg y col., 1992). La primera transición endotérmica corresponde a la fusión de la forma α metaestable centrada alrededor de 50°C, mientras que la transición exotérmica se corresponde a la transformación de forma β' estable cristalina que funde endotérmicamente a 66°C (López-García y col., 1999a; Kodali y col., 1990; Shannon y col., 1992). En este caso, el problema es que hay un solapamiento del pico correspondiente al complejo fosfolípido/diacilglicerol y el pico de la transición de la forma α .

3.2. Medidas de la transición de fase mediante espectroscopía de infrarrojo.

Para una mayor clarificación del origen de las distintas transiciones observadas en los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido, se utilizó la espectroscopía de infrarrojo. Se analizaron las transiciones de fase de las mezclas de POPC/POPS (relación molar 4:1) con diferentes cantidades de 1,2-*sn*-DPG- d_{62} . Los máximos de las frecuencias de vibración de la tensión simétrica de los grupos CH₂ (2853 cm⁻¹) y CD₂ (2090 cm⁻¹) de las cadenas acílicas de los lípidos se representaron en función de la temperatura para cada una de las muestras (Figura III.2). Está demostrado que un cambio en la frecuencia de esta vibración es una indicación fiable de la transición de fase gel a fase líquido-cristalina en dispersiones acuosas de fosfolípidos (Casal y Mantsch, 1984; Cameron y Mantsch, 1982).

La mezcla de fosfolípidos puros sin DPG presentó una transición que comenzaba alrededor de -3°C (Figura III.2A), como se desprende del análisis de la vibración de la tensión simétrica del grupo CH₂. Cuando se estudió la muestra que contenía 20 mol % de DPG- d_{62} , el máximo de la frecuencia de vibración de tensión simétrica del grupo CH₂ de los fosfolípidos cambió con la temperatura y mostró una transición ancha, que comenzó a 9°C y acabó alrededor de los 36°C, con un perfil que sugiere la presencia de dos componentes diferentes en la misma (Figura III.2A). Este rango de temperaturas es bastante similar al encontrado mediante calorimetría diferencial de barrido para la muestra con la misma composición lipídica.

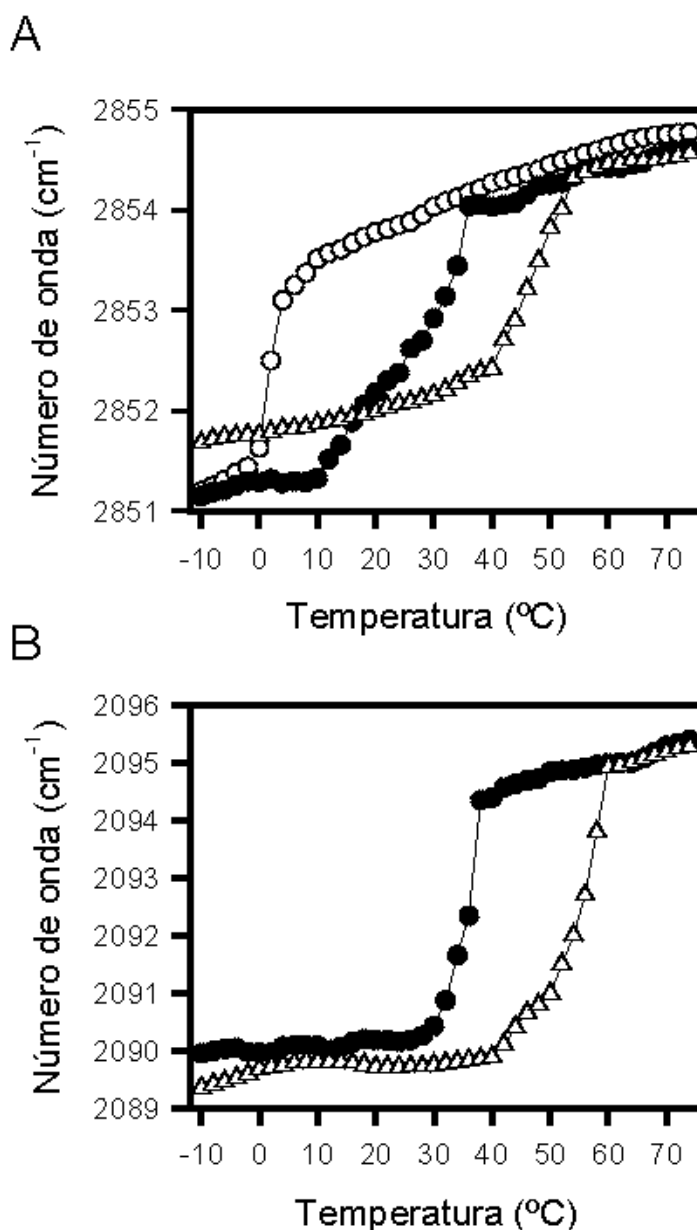


Figura III.2. Dependencia de las frecuencias de vibración de tensión simétricas de los grupos CH_2 (A) y CD_2 (B) con la temperatura. Se representa la variación en la frecuencia de vibración de tensión simétrica de los grupos CH_2 (2853 cm^{-1}) y CD_2 (2090 cm^{-1}) respecto a la temperatura de mezclas de POPC/POPS a una relación molar 4:1, ionóforo A23187 y 0 mol % (o), 20 mol % (●) y 50 mol % (Δ) de 1,2-*sn*-DPG- d_{62} , en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Se prepararon 5 μmoles de la mezcla de fosfolípidos con la correspondiente cantidad de 1,2-*sn*-DPG- d_{62} . Las muestras se examinaron en una célula temostatizada Specac 20710 (Specac, Kent, Inglaterra) equipada con ventanas de CaF_2 y utilizando espaciadores de teflón de 25 μm . Para cada espectro se acumularon 128 interferogramas con una resolución nominal de 2 cm^{-1} . Los espectros se recogieron desde -10°C hasta 74°C , en intervalos de 2°C , con un tiempo de espera para el equilibrio de la temperatura de 4 minutos. La sustracción de los espectros frente a tampón se realizó interactivamente con el programa Spectra-Calc (Galactic Industries Corp., Salem, NH, Estados Unidos).

Cuando se analizó la variación de la frecuencia de vibración de la tensión simétrica del grupo CD₂ (Figura III.2B), se observó que la transición observada era más estrecha que la obtenida siguiendo la tensión simétrica del grupo CH₂, ya que comenzó a 29°C y acabó alrededor de los 38°C, con lo que parece corresponderse con el segundo componente de la transición ancha observada para el grupo CH₂. Esto parece sugerir que puede existir una separación de fases entre una que funde a una temperatura más baja y está compuesta principalmente por fosfolípido con una cantidad de DPG muy pequeña, y otra fase con la mayor parte de DPG y una fracción de los fosfolípidos. La transición ancha de los fosfolípidos corresponde probablemente al pico ancho observado por calorimetría diferencial de barrido en la muestra con 20 mol % de DPG (Figura III.1).

La muestra que contenía 50 mol % DPG-*d*₆₂ presentó una transición alrededor de los 41°C, como se pudo observar a través de la frecuencia de vibración de la tensión simétrica del grupo CH₂ (Figura 2A), la cual además coincide con la temperatura de transición determinada al analizar el grupo CD₂ (Figura 2B). Así pues, en este caso, tanto el fosfolípido (grupo CH₂) como el diacilglicerol (CD₂) mostraron la transición a la misma temperatura, lo cual indicó que estaban bien mezclados en esta muestra.

3.3. Espectroscopía de ³¹P-RMN.

El efecto del 1,2-*sn*-DPG sobre el polimorfismo de fase de la mezcla de POPC/POPS (relación molar 4:1) se estudió mediante espectroscopía de ³¹P-RMN. En la Figura III.3 se muestran los espectros de las dispersiones acuosas de diferentes mezclas lipídicas de POPC/POPS y DPG en presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺ a distintas temperaturas (25, 35 y 70°C).

En ausencia de DPG, la mezcla de fosfolípidos POPC/POPS a una relación molar 4:1 dio lugar a un espectro asimétrico, con un pico a alto campo y un hombro a

bajo campo (Figura III.3A) a todas las temperaturas estudiadas. Este espectro es característico de un desplazamiento de tensión simétrico axialmente, consistente con la idea de que los fosfolípidos se encuentren en configuración de bicapa. Los perfiles obtenidos son anchos, con un desplazamiento químico anisotrópico residual ($\Delta\sigma$) de aproximadamente 43 ppm a 25°C, 42 ppm a 35°C y 41 ppm a 70°C. De acuerdo con los datos de calorimetría diferencial de barrido mostrados anteriormente, nos encontramos con estado fluido en todas las temperaturas estudiadas.

Los espectros de la muestra con 20 mol % de DPG (Figura III.3B) mostraron un perfil similar al observado en la muestra de fosfolípido puro a las mismas temperaturas, con un $\Delta\sigma$ de 56 ppm a 25°C, 42 ppm a 35°C y 41 ppm a 70°C. De acuerdo con la calorimetría diferencial de barrido, la mezcla lipídica sufre una segunda transición que termina alrededor de los 41°C. Por ello, el análisis a 25°C se encuentra parcialmente en fase gel, mientras que el espectro recogido a 35°C puede tener también un pequeño porcentaje de fosfolípidos en dicha fase. En cambio, la muestra analizada a 70°C se encuentra ya en estado fluido.

La muestra que contenía 40 mol % de DPG (Figura III.3C) se encuentra en estado gel para los análisis a 25 y 35°C, como se observa mediante la calorimetría diferencial de barrido (temperatura de transición a 49°C, Figura III.1). Los espectros correspondientes de ^{31}P -RMN presentan patrones asimétricos, que son indicativos de fase gel en bicapa, con un $\Delta\sigma$ de 65 ppm a 25°C y 64 ppm a 35°C. En cambio, el análisis a 70°C, donde el sistema se encuentra por encima de la transición de fase según la calorimetría diferencial de barrido (Figura III.1), presentó un espectro diferente, con una componente isotrópica por encima de otras que presentan anisotropía axial. Este espectro mostró un desplazamiento químico anisotrópico residual de signo contrario al de la fase lamelar, siendo característico de una fase cilíndrica que se corresponde con una fase hexagonal invertida H_{II} , aunque no se puede descartar totalmente la presencia adicional de un componente lamelar. Esta situación compuesta por una fase heterogénea explicaría el valor $\Delta\sigma$ observado de 35 ppm, que es muy alto para un espectro puro de fase H_{II} , que según se ha descrito tendría un valor de sólo 20 ppm (Seelig, 1978; Gallay y de Kruijff, 1984).

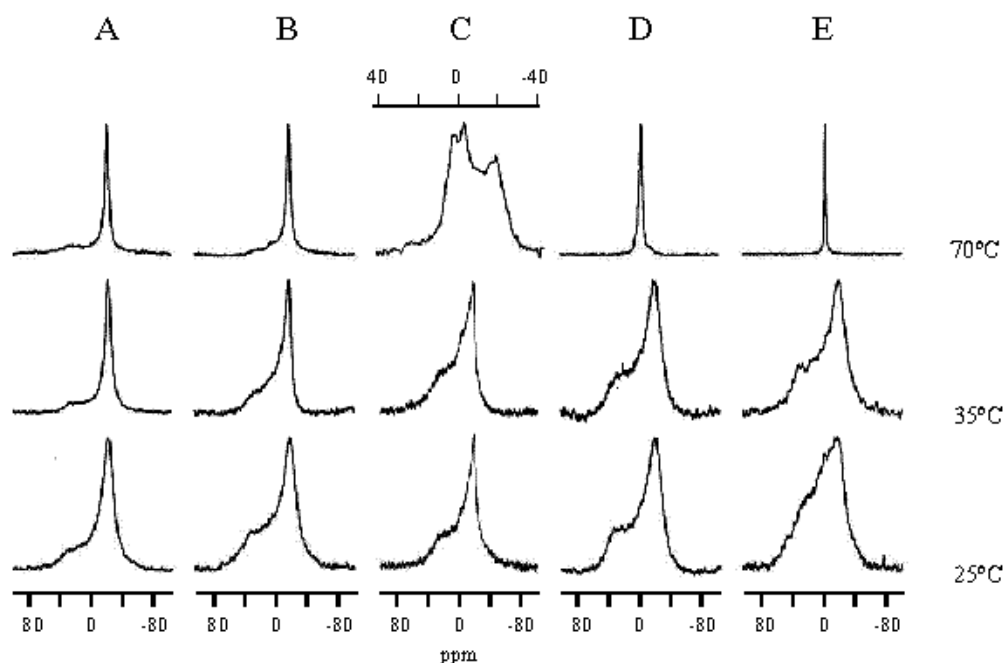


Figura III.3. Espectros de ^{31}P -RMN del sistema lipídico POPC/POPS/DPG estudiado. Se prepararon mezclas lipídicas, en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} que contenían POPC/POPS en relación molar 4:1, ionóforo A23187 y diferentes cantidades de 1,2-*sn*-DPG: 0 mol % (A), 20 mol % (B), 40 mol % (C), 60 mol % (D) y 80 mol % (E). Las concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} utilizadas fueron 260 mM y 6,5 M respectivamente, para asegurar la misma relación molar de los iones frente a POPS (Ca^{2+} /POPS de 2,1 y Mg^{2+} /POPS 52,1) que en los ensayos de calorimetría diferencial de barrido. Las temperaturas analizadas se muestran a la derecha. La escala de ppm para la muestra de 40 mol % de DPG a 70°C se muestra ampliada para permitir una mejor observación del espectro recogido. Los espectros se obtuvieron en el modo de transformada de Fourier en un espectrómetro Varian Unity 300, con un pulso de desacoplamiento de protones de banda ancha (5W de potencia de entrada durante el tiempo de adquisición), una anchura espectral de 25.000 Hz, una memoria de 32.000 puntos, un tiempo entre los pulsos de 2 segundos y a 80° de pulso de radiofrecuencia (11 μs). Previamente a la transformación de Fourier, se aplicó una multiplicación exponencial, cuyo resultado fue un ensanchamiento de línea de 60 Hz.

La muestra de 60 mol % de DPG (Figura III.3D), a 25 y 35°C, por debajo de la temperatura de transición de fase, como indica la calorimetría diferencial de barrido (Figura III.1), presenta unos espectros anchos y anisotrópicos, con un valor de $\Delta\sigma$ de 64 ppm en ambas temperaturas, como cabe esperar de una configuración en bicapa en estado gel. Por encima de la temperatura de transición (a 70°C), se observa un espectro predominantemente isotrópico, aunque también se detectan unos componentes anisotrópicos muy pequeños.

Finalmente, la muestra con 80 mol % de DPG (Figura III.3E), a 25 y 35°C, de nuevo por debajo de la temperatura de transición de fase de acuerdo con la calorimetría diferencial de barrido (Figura III.1), muestra un espectro de ^{31}P -RMN anisotrópico ancho, característico de una fase lamelar en estado gel, con un $\Delta\sigma$ de 67 ppm a 25°C y 64 ppm a 35°C. Sin embargo, el espectro a 70°C, temperatura a la cual nos encontramos por encima de la transición de fase según la calorimetría diferencial de barrido, muestra un aspecto claramente isotrópico.

3.4. Diagrama de fases del sistema POPC/POPS/DPG.

Utilizando los datos obtenidos mediante la calorimetría diferencial de barrido y la espectroscopía de ^{31}P -RMN, se puede construir el diagrama de fases para las muestras lipídicas en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} (Figura III.4). Las líneas de separación de los estados sólido y fluido fueron determinadas por las temperaturas de inicio y finalización de las transiciones de los barridos de calorimetría diferencial de barrido de las mezclas de POPC/POPS (relación molar 4:1) con cantidades variables de 1,2-*sn*-DPG. La espectroscopía de ^{31}P -RMN se utilizó para caracterizar la organización de las fases de las muestras a las distintas temperaturas.

El diagrama de fases parece estar caracterizado por la presencia de dos complejos y, consecuentemente, tres regiones, como también puede observarse en otras mezclas de diacilglicerol/fosfolípido con fosfolípidos saturados, como DMPC y DPPC (Heimburg y col., 1992; López-García y col., 1994a; Hinderliter y col., 1997), e insaturados, como POPC y POPS (Senisterra y Epan, 1993).

En nuestro caso, se proponen dos puntos eutécticos, uno a una muy baja concentración de DPG y otro a una concentración de DPG cercana a 65 mol %. Un primer complejo (CO1) parece formarse a una concentración de DPG cercana a 35 mol %, basándonos en los termogramas de calentamiento y enfriamiento de la calorimetría diferencial de barrido, donde se observa un pico muy estrecho centrado

en 48°C que aparece en la muestra de 35 mol % de DPG. Un segundo complejo puro (CO2) se formaría alrededor de 65 mol % de DPG, como sugiere el hecho de que el DPG puro aparezca separado de fase a concentraciones superiores.

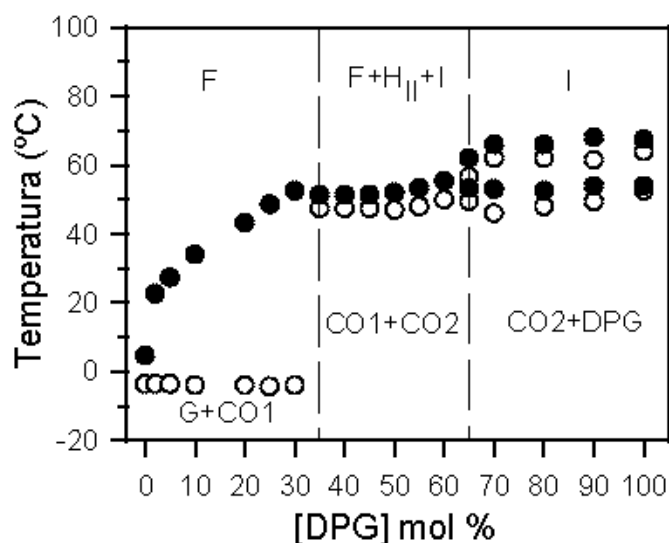


Figura III.4. Diagrama de fases del sistema POPC/POPS (relación molar 4:1) con diferentes proporciones de 1,2-*sn*-DPG en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Este diagrama de fases se elaboró utilizando los datos obtenidos de la calorimetría diferencial de barrido y la espectroscopia de ^{31}P -RMN. Las temperaturas de inicio (o) y finalización (*) de la transición de los barridos de calentamiento obtenidos por calorimetría definen las distintas regiones del diagrama de fases. G y F significan fosfolípidos en fase gel y fluida, respectivamente. H_{II} e I son fase hexagonal invertida e isotrópica, respectivamente. CO1 y CO2 son los complejos fosfolípido/diacilglicerol 1 y 2, respectivamente.

Las líneas sólidas que aparecen en el diagrama de fases sugieren la inmiscibilidad sólido-sólido. En la región I del diagrama de fases, es decir desde el fosfolípido puro sin DPG hasta una concentración de DPG de 35 mol %, y por debajo de la temperatura de transición, la inmiscibilidad se observa entre el primer complejo formado y el fosfolípido puro. De cualquier manera, por encima de la temperatura de transición hay una buena miscibilidad. En la región II, entre 35 y 65 mol % DPG, hay una inmiscibilidad sólido-sólido en la fase gel entre el primer y segundo complejo, mientras que en la fase fluida hay una coexistencia de fase lamelar, fase hexagonal invertida H_{II} y fase isotrópica.

El DPG libre comienza a separarse a concentraciones superiores a 65 mol %. En la región III hay una separación de fase entre el segundo complejo y el DPG puro libre en la fase gel. En la región fluida, sólo se detectó una fase isotrópica mediante la espectroscopia de ^{31}P -RMN, la cual correspondería posiblemente a fase cúbica, de acuerdo con estudios detallados con otros sistemas diacilglicerol/fosfolípido (López-García y col., 1994a; Seddon, 1990b; Luzzati y col., 1992; Quinn y col., 1995).

3.5. Activación y enlace a membranas de la PKC α tipo silvestre y mutante D246/248N en función de la concentración de diacilglicerol.

Cuando se utilizó DPG, las medidas de actividad y enlace a membrana de la PKC α se realizaron a 27°C, de forma que el sistema se encontraba por debajo de la temperatura de transición de fase a todas las concentraciones analizadas por encima de 10 mol % de DPG, según los datos proporcionados por la calorimetría diferencial de barrido (Figura III 1). Solamente las muestras con una concentración inferior a 10 mol % de DPG se encontraban por encima de la temperatura de transición. No fue posible estudiar la actividad de la enzima en función de la concentración de DPG en el estado fluido, por encima de la temperatura de transición, ya que este sistema tiene la transición de fase por encima de 40°C con las mezclas de concentraciones superiores a 20 mol % de DPG y dicha temperatura es demasiado alta para garantizar la estabilidad de la enzima.

La Figura III. 5A muestra la relación existente entre la activación de la PKC α y la concentración de DPG. Como se puede observar, la actividad de la PKC α aumentó considerablemente con bajas concentraciones de DPG (5 mol %), llegando hasta un nivel máximo con 30 mol %. A partir de esta concentración, la actividad de la PKC α disminuyó, llegando a valores muy bajos con altas concentraciones de DPG (70 y 80 mol % de DPG).

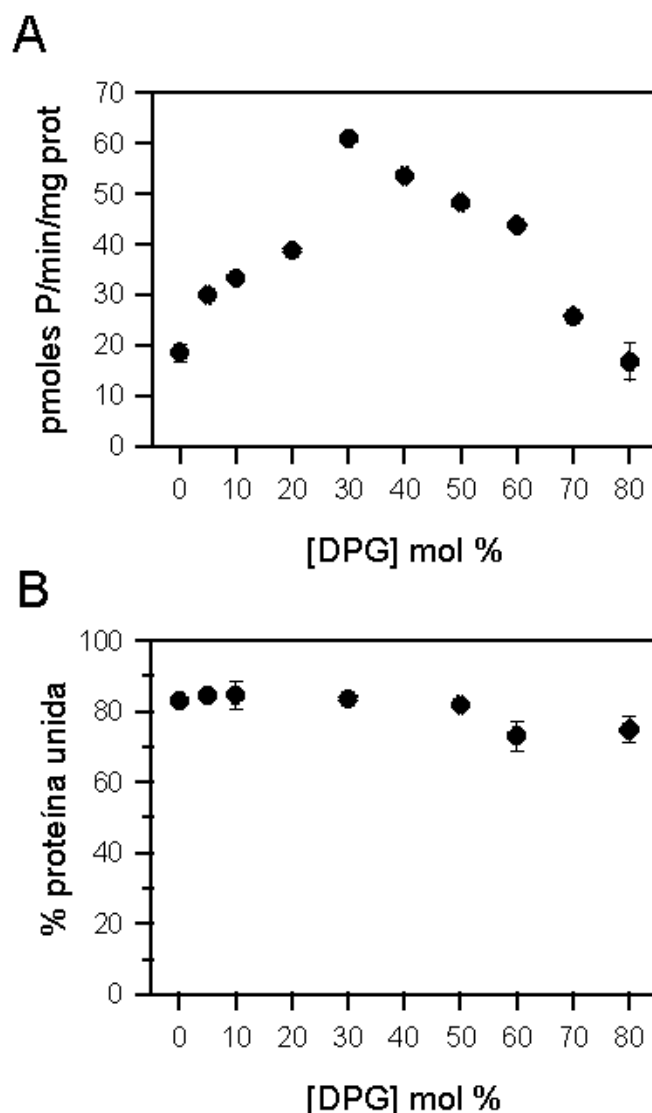


Figura III.5. Activación (A) y enlace a membrana (B) de la PKC α tipo silvestre en función de la concentración creciente de DPG. Se utilizaron mezclas lipídicas con POPC/POPS, a una relación molar 4:1, ionóforo A23187 y distintas proporciones de 1,2-*sn*-DPG. Los ensayos se llevaron a cabo a 27°C en presencia de CaCl₂ 200 μ M y MgCl₂ 5 mM, como se explica en el apartado de Métodos Generales del Capítulo II. Para los ensayos de actividad se midió la actividad basal de la proteína en presencia de EGTA 1 mM y en ausencia de lípidos (POPC/POPS y diacilglicerol) y Ca²⁺, la cual fue sustraída de los resultados. Asimismo, se realizaron controles con lisados celulares de células no transfectadas para descartar la actividad endógena de PKC α . La linealidad del ensayo se confirmó analizando la cantidad de histona fosforilada frente a la cantidad de proteína utilizada, así como frente al tiempo de ensayo (hasta 45 min). Para valorar el enlace de la PKC α a la membrana se utilizó electroforesis, electrotransferencia e inmunoanálisis. La cantidad de proteína enlazada a membrana o libre se cuantificó por densitometría. La cantidad de proteína utilizada se mantuvo dentro del rango lineal de detección de los reactivos del ensayo de inmunoanálisis. El volumen final de la reacción para ambos tipos de ensayos fue de 250 μ L, la concentración de la mezcla fosfolipídica fue de 480 μ M, la cantidad de proteína utilizada fue de 0,1 μ g aproximadamente y el tiempo de reacción fue de 20 min. Los gráficos representan los valores medios y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Por otro lado, la influencia de la concentración de DPG en el enlace de la PKC α a la membrana mostró que la proteína se encontraba enlazada a la mezcla lipídica utilizada prácticamente de forma máxima y en la misma proporción (en torno al 80%) para todas las concentraciones de DPG analizadas, desde 0 a 80 mol % (Figura III.5B).

Para aclarar si el comportamiento de la enzima era similar al observado con otros diacilglicerol, se analizó la actividad y el enlace de la PKC α a la membrana en presencia de un diacilglicerol insaturado, el 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicerol (POG). Estos ensayos se realizaron a 32°C, temperatura que se encuentra por encima de la transición de fase para este sistema (Jiménez-Monreal y col., 1999). La Figura III.6A muestra la relación entre la activación de la PKC α y la concentración de POG. La actividad de la PKC α aumentó sustancialmente con bajas concentraciones de POG (de 5 a 10 mol %), alcanzando unos valores que prácticamente se mantuvieron estables hasta 40 mol % y llegando a un nivel máximo con 50 mol %, a partir de donde dicha actividad disminuyó. Se observó muy poca actividad a 12°C, temperatura que se encuentra por debajo de la transición de fase (datos no mostrados). Por otro lado, cuando se analizó el enlace de la PKC α a membranas con POG a 32°C, se observó que éste no cambió apreciablemente a las distintas concentraciones ensayadas, manteniéndose alrededor de 70-80 % en todos los casos (Figura III.6B).

Estos resultados indican que en presencia de 200 μ M CaCl $_2$ y 5 mM MgCl $_2$ y con POPS en las membranas, la enzima es capaz de enlazarse de forma máxima a la membrana, incluso en ausencia de diacilglicerol, probablemente a través del dominio C2 de la proteína, el cual se caracteriza por interactuar con Ca $^{2+}$ y fosfatidilserina (Verdaguer y col., 1999). Destaca el hecho de que este enlace no está acompañado de máxima activación, la cual sólo se adquiere en presencia de una concentración suficientemente alta de diacilglicerol (DPG o POG), lo cual sugiere la participación del enlace del dominio C1 de la proteína en este proceso.

Esta interpretación se confirmó a continuación mediante el estudio del enlace a membranas del dominio C2 aislado de la PKC α , en presencia de proporciones crecientes de los diacilglicerol (DPG o POG).

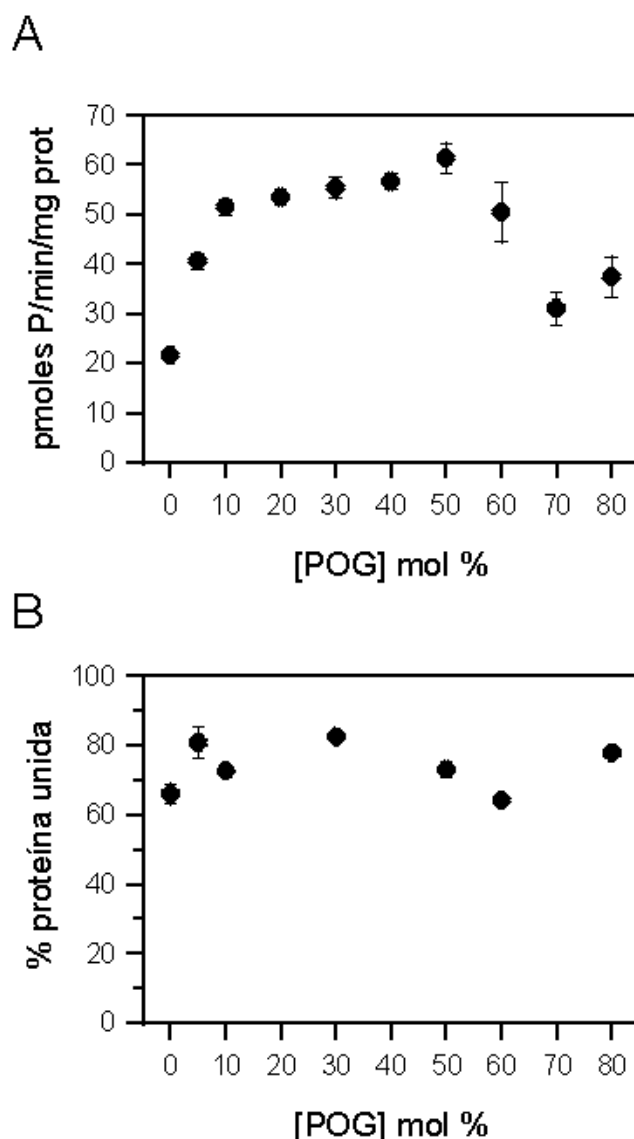


Figura III.6. Activación (A) y enlace a membrana (B) de la PKC α tipo silvestre en función de la concentración creciente de POG. Se utilizaron mezclas lipídicas con POPC/POPS, a una relación molar 4:1, ionóforo A23187 y distintas proporciones de 1,2-*sn*-POG. Los ensayos se llevaron a cabo a 32°C en presencia de CaCl₂ 200 μ M y MgCl₂ 5 mM, como se explica en el apartado de Métodos Generales del Capítulo II. Para los ensayos de actividad se midió la actividad basal de la proteína en presencia de EGTA 1 mM y en ausencia de lípidos (POPC/POPS y diacilglicerol) y Ca²⁺, la cual fue sustraída de los resultados. Asimismo, se realizaron controles con lisados celulares de células no transfectadas para descartar la actividad endógena de PKC α . La linealidad del ensayo se confirmó analizando la cantidad de histona fosforilada frente a la cantidad de proteína utilizada, así como frente al tiempo de ensayo (hasta 45 min). Para valorar el enlace de la PKC α a la membrana se utilizó electroforesis, electrotransferencia e inmunoanálisis. La cantidad de proteína enlazada a membrana o libre se cuantificó por densitometría. La cantidad de proteína utilizada se mantuvo dentro del rango lineal de detección de los reactivos del ensayo de inmunoanálisis. El volumen final de la reacción para ambos tipos de ensayos fue de 250 μ L, la concentración de la mezcla fosfolipídica fue de 480 μ M, la cantidad de proteína utilizada fue de 0,1 μ g aproximadamente y el tiempo de reacción fue de 20 min. Los gráficos representan los valores medios y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Estos ensayos mostraron que el dominio C2 de la PKC α se unió prácticamente en la misma proporción y de forma máxima (alrededor del 75-85% de la proteína total) a todas las concentraciones de DPG y POG de las mezclas utilizadas, e incluso en su ausencia (Figura III.7).

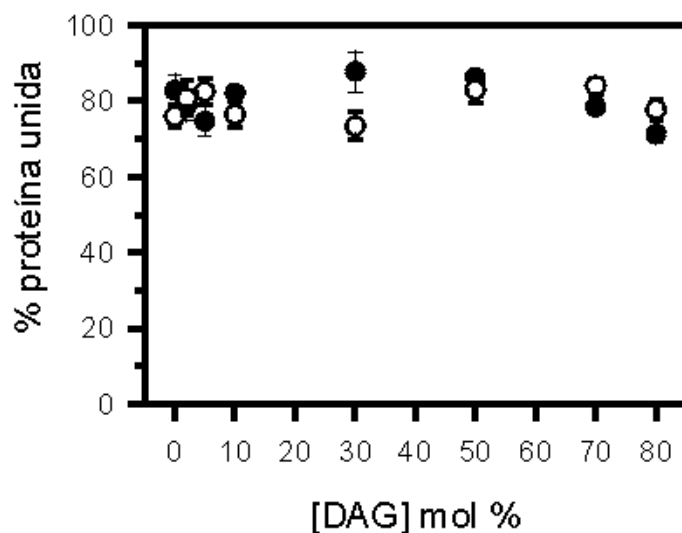


Figura III.7. Enlace a membrana del dominio C2 de la PKC α en función de la concentración de diacilglicerol. Se utilizaron mezclas lipídicas con POPC/POPS, a una relación molar 4:1, y distintas proporciones de DPG (●) y POG (○). Los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura de 27°C para DPG y 32°C para POG, y en presencia de CaCl₂ 200 μ M y MgCl₂ 5 mM, como se explica en el apartado de Métodos Generales del Capítulo II. Para valorar el enlace del dominio C2 de la PKC α a la membrana se utilizó electroforesis, electrotransferencia e inmunoanálisis. La cantidad de proteína enlazada a membrana o libre se cuantificó por densitometría. La cantidad de proteína utilizada se mantuvo dentro del rango lineal de detección de los reactivos del ensayo de inmunoanálisis. El volumen final de reacción fue de 250 μ L, la concentración de la mezcla fosfolipídica fue de 480 μ M, la cantidad de proteína utilizada fue de 0,5 μ g aproximadamente y el tiempo de reacción fue de 20 min. Los gráficos representan los valores medios y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Ya que los resultados anteriores sugieren que los patrones de activación por diferentes diacilgliceroles mostrados en las Figuras III.5 y III.6 parecen depender de la interacción de los diacilgliceroles con el dominio C1 de la proteína, se utilizó un doble mutante de la enzima, llamado D246/248N. Este mutante presenta los residuos Asp de las posiciones 246 y 248 situadas en el dominio C2 sustituidos por residuos

de Asn. De esta forma, el mutante D246/248N de la PKC α presenta un dominio C2 alterado, el cual es incapaz de unir Ca²⁺, por lo que cualquier actividad o enlace observado con dicho mutante se deberá al dominio C1. Los residuos Asp de las posiciones 246 y 248 del dominio C2 de la PKC α están involucrados en la unión de Ca²⁺ y estas dos mutaciones a Asn inhiben la unión del dominio C2 a la membrana, tanto *in vitro* como *in vivo* (Corbalán-García y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2000; Bolsover y col., 2003).

Es interesante destacar, en este sentido, que el DPG no activó al mutante D246/248N de la PKC α a ninguna de las concentraciones analizadas, mientras que POG sí lo consiguió (Figura III.8A). De esta forma, conforme se incrementaba la concentración de este diacilglicerol, la actividad del mutante D246/248N de la PKC α aumentó, llegando a un máximo en torno a 50 mol % de POG y mostrando a partir de entonces un descenso con concentraciones mayores, lo cual es una reminiscencia del patrón mostrado por la proteína tipo silvestre (Figura III.6A).

También destaca el hecho de que este patrón observado en la actividad del mutante D246/248N de la PKC α estaba bien correlacionado con el patrón observado en el ensayo de enlace a membrana (Figura III.8B), ya que en presencia de POG, este mutante se enlazó a la membrana de forma gradual, a diferencia de la enzima tipo silvestre (Figura III.6B), alcanzando un máximo a 40 mol % de POG y disminuyendo entonces con concentraciones mayores, mostrando así una dependencia por las concentraciones de POG similar a la mostrada en los ensayos de actividad enzimática. Por otro lado, el enlace del mutante D246/248N de la PKC α a la membrana en presencia de DPG estaba mucho más reducida y no se observó cambio apreciable en dicho enlace con el aumento de las concentraciones de este diacilglicerol (Figura III.8B).

Así, parece claro que la introducción de una insaturación en una de las cadenas acílicas del diacilglicerol que forma parte de la mezcla lipídica modifica en gran medida su capacidad para activar a la enzima.

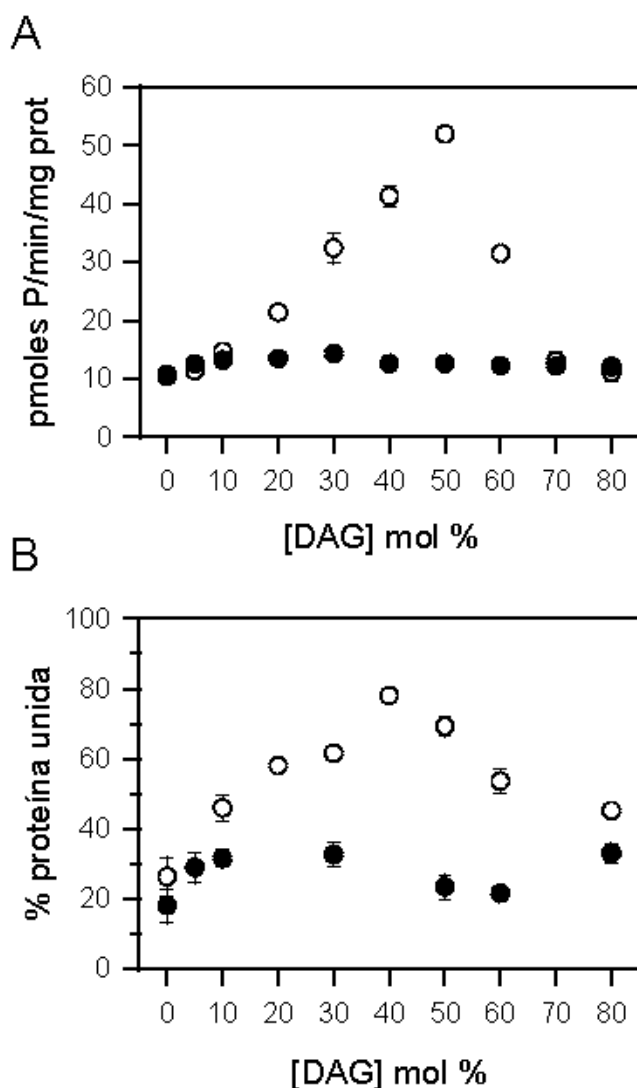


Figura III.8. Activación (A) y enlace a membrana (B) del mutante D246/248N de la PKC α en función de la concentración creciente de diacilglicerol. Se utilizaron mezclas lipídicas con POPC/POPS, a una relación molar 4:1, ionóforo A23187 y distintas proporciones de 1,2-*sn*-DPG (●) y 1,2-*sn*-POG (○). Los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura de 27°C para las muestras con DPG y a 32°C para las de POG, en presencia de CaCl₂ 200 μ M y MgCl₂ 5 mM, de la forma como se explica en el apartado de Métodos Generales del Capítulo II. Para los ensayos de actividad se midió la actividad basal de la proteína en presencia de EGTA 1 mM y en ausencia de lípidos (POPC/POPS y diacilglicerol) y Ca²⁺, la cual fue sustraída de los resultados. Asimismo, se realizaron controles con lisados celulares de células no transfectadas para descartar la actividad endógena de PKC α . La linealidad del ensayo se confirmó analizando la cantidad de histona fosforilada frente a la cantidad de proteína utilizada, así como frente al tiempo de ensayo (hasta 45 min). Para valorar el enlace de la PKC α a la membrana se utilizó electroforesis, electrotransferencia e inmunanálisis. La cantidad de proteína enlazada a membrana o libre se cuantificó por densitometría. La cantidad de proteína utilizada se mantuvo dentro del rango lineal de detección de los reactivos del ensayo de inmunanálisis. El volumen final de la reacción para ambos tipos de ensayos fue de 250 μ L, la concentración de la mezcla fosfolipídica fue de 480 μ M, la cantidad de proteína utilizada fue de 0,1 μ g aproximadamente y el tiempo de reacción fue de 20 min. Los gráficos representan los valores medios y las desviaciones típicas de tres experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

4. DISCUSIÓN.

En este trabajo hemos tratado de correlacionar las propiedades físicas de una mezcla de lípidos con su influencia en el enlace de la PKC α a la membrana y sus parámetros de actividad. La mezcla lipídica seleccionada estaba formada por fosfolípidos insaturados (POPC y POPS), que recuerdan a los de las membranas biológicas, y diacilglicerol, tanto saturados (DPG) como insaturados (POG). Se ha descrito, de hecho, que ambos tipos de diacilglicerol pueden estar presentes durante la estimulación celular, la cual es a menudo bifásica. Así, durante las etapas tempranas, los diacilglicerol acumulados son principalmente monoinsaturados o saturados en la posición acílica *sn*-1 y poliinsaturados en la posición *sn*-2, mientras que durante la fase de sostenimiento los tipos de diacilglicerol predominantes poseen cadenas acílicas saturadas en ambas posiciones o una cadena saturada en posición *sn*-1 y una cadena monoinsaturada en posición *sn*-2 (Hodking y col., 1998). De acuerdo con los resultados obtenidos, se propone que el dominio C2 es muy importante para la activación durante la fase de sostenimiento, cuando los diacilglicerol saturados, como DPG, son abundantes, en cuyo caso no podrían activar una enzima con un dominio C2 no funcional.

Mientras las características físicas del sistema con POG habían sido descritas con anterioridad (Jiménez-Monreal y col., 1999), en este trabajo llevamos a cabo la caracterización física del sistema con DPG. Las mezclas lipídicas fueron estudiadas incluyendo las mismas concentraciones de Ca²⁺ y Mg²⁺ que se utilizaron en los ensayos enzimáticos, y las estructuras lamelares se mantuvieron, al menos a bajas concentraciones de diacilglicerol, ya que se utilizaron mezclas de POPC/POPS con una relación molar 4:1. Se sabe que la utilización de POPS puro lleva a obtención de fases con cocleatos en presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺ (Papahadjopoulos y col., 1974; Papahadjopoulos y col., 1975; Feigenson, 1986), las cuales carecen de transición de fase en el rango fisiológico de temperaturas utilizadas en este trabajo (Hauser y Shipley, 1984). De cualquier manera, demostramos previamente mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) que la mezcla POPC/POPS en relación molar 4:1 no está deshidratada por Ca²⁺ y Mg²⁺, cuando las

relaciones molares $\text{Ca}^{2+}/\text{POPS}$ y $\text{Mg}^{2+}/\text{POPS}$ son 2,6 y 66, valores muy similares a los utilizados en este trabajo (Sánchez-Piñera y col., 1999a). Cuando la cantidad de POPC alcanza el 80 % de la total de fosfolípido, se protege a POPS de la formación de la fase con cocleatos, incluso en presencia de 33 mol % de DAG (Sánchez-Piñera y col., 1999a).

Hemos intentado correlacionar la activación de la $\text{PKC}\alpha$ a distintas concentraciones de diacilglicerol con el estado físico de la membrana, ya que se ha demostrado que la variación de la concentración de diacilglicerol tiene un gran efecto en la organización de la membrana.

En el caso del sistema con DPG, la actividad máxima se alcanzó a la concentración de DPG a la que se obtiene el compuesto puro CO1 (30 mol % DPG), lo cual puede deberse a que la coexistencia de dominios separados (uno de ellos rico en diacilglicerol) estimula la actividad, como se ha propuesto anteriormente (Hinderliter y col., 1997). Otra posibilidad es que el aumento del compuesto CO1 pueda contribuir a aumentar la actividad, mientras que el compuesto CO2 que comienza a aparecer con concentraciones de DPG superiores a 30 mol %, pueda ser menos adecuado para promover la activación de la $\text{PKC}\alpha$. En el caso de la activación inducida por POG, la actividad aumenta conforme aumentan las concentraciones de POG hasta 10 mol %, donde se alcanza una estabilización. En este caso la actividad está medida por encima de la temperatura de transición de fase y por lo tanto no parece ocurrir separación de fases.

De cualquier modo, está claro que la enzima tipo silvestre se une a la membrana de la misma forma en todo el rango de concentraciones estudiado, debido quizás a la interacción lípido-proteína establecida bien a través del dominio C1 o bien a través del dominio C2. De cualquier forma, ya que se observó que el dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$ aislado se unió máximamente a todas las concentraciones de DPG utilizadas e incluso en su ausencia, parece claro que el DPG debe afectar a la activación de la enzima sólo a través del dominio C1 y no a través del dominio C2, a pesar del hecho de que a muy altas concentraciones de DPG pudiera producirse una

dilución sustancial de la POPS. Esta dilución probablemente no tuvo efecto sobre la actividad ya que el exceso del DPG acumulado en la región III del diagrama de fases estaría separado de fase del compuesto CO₂, donde estaría localizada la POPS.

Para aclarar con mayor profundidad el papel del dominio C1 en este proceso, se utilizó el doble mutante D246/248N de la PKC α . Este mutante se caracterizó previamente y se demostró que tenía una capacidad muy limitada para activarse mediante fosfolípidos y Ca²⁺ (Corbalán-García y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2000; Bolsover y col., 2003), ya que los residuos mutados están involucrados en la unión de Ca²⁺ al dominio C2. De acuerdo con nuestros resultados, el mutante D246/248N de la PKC α no fue activado por DPG ni pudo unirse a membranas de forma significativa, ni siquiera en ausencia de este diacilglicerol. Esto demuestra que DPG no fue capaz de compensar el descenso en la capacidad de unión de la proteína debido a la mutación en el dominio C2 responsable de la unión a través de Ca²⁺ y fosfatidilserina. De cualquier modo, en presencia del POG, el mutante se pudo activar al mismo nivel que el tipo silvestre utilizando una concentración de POG lo suficientemente alta (50 mol %), lo cual se correlacionó bastante bien con lo observado en la unión a membranas.

La pregunta que surge inevitablemente es por qué el POG es mejor activador que el DPG. La respuesta la da la mayor capacidad de inducir el enlace de la enzima mutante a la membrana mostrada por el POG. Una explicación para este comportamiento ya se propuso con anterioridad aduciendo que los diacilglicerol insaturados producen un aumento en el volumen de la parte de hidrocarbóno y también un aumento en el espaciamiento de los grupos de cabeza, lo cual podría facilitar la inserción de la enzima en la membrana (Bolen y Sando, 1992). Alternativamente, ya que el sistema con el POG se encontraba en condición de estado fluido, mientras que el sistema con el DPG estaba por debajo de la transición de fase, otra posible respuesta para la anterior pregunta supondría que fuera más difícil para la proteína insertar su dominio C1 en una membrana rígida que en otra fluida. Esto no pudo analizarse estudiando el comportamiento de la PKC α por debajo de la transición de fase en presencia del POG, ya que la actividad de la enzima fue

muy baja a temperaturas cercanas a los 12°C. Recordemos que anteriormente se demostró que utilizando micelas mixtas formadas con Tritón X-100, tanto con DPG como con POG, se obtuvo una capacidad de activar la PKC similar (Sánchez-Piñera y col., 1999a) y que los diferentes comportamientos mostrados aquí parecen deberse más a efectos en la estructura de la membrana que a reconocimiento diferencial por parte del dominio C1.

La otra incógnita es por qué la actividad y la unión a membrana de la proteína disminuyen a concentraciones muy altas de POG, como se observa por encima de la transición de fase. Una posible explicación podría ser la formación de fases cúbicas, adoptadas por mezclas con fosfolípidos y altas concentraciones de DAG (Seddon, 1990a; Luzzati y col., 1992), las cuales pueden ser menos apropiadas para la activación de la PKC.

Existen abundantes pruebas para apoyar la interacción de la PKC α con membranas. Así, mediante experimentos de monocapas se concluyó que la PKC α penetra en la membrana a ciertas concentraciones lipídicas (Lester y col., 1990; Souvignet y col., 1991; Medkova y Cho, 1998b). Además, mediante experimentos de monocapas se demostró que las interacciones hidrofóbicas entre la PKC y las cadenas acílicas lipídicas son esenciales para la activación de la proteína (Souvignet y col., 1991). Recientemente se concluyó que la PKC α penetra parcialmente en la membrana durante su activación mediante fosfatidilserina (Medkova y Cho, 1998b). Hay también otros muchos estudios que sugieren que la activación de la PKC por diacilglicerol puede involucrar una perturbación específica inducida por diacilglicerol en la estructura de la bicapa fosfolipídica de la membrana. Por ejemplo, se ha demostrado que cambios en cadenas acílicas de los lípidos de la membrana afectan tanto a la activación dependiente de lípidos de la PKC como a la acción de los diacilglicerol (Bolen y Sando, 1992; Snoek y col., 1988). Por otro lado, está claro que los diacilglicerol afectan en gran medida a la estructura de la membrana (Zidovetzki, 1997). Todos estos datos apoyan, por lo tanto, la posibilidad de que un diacilglicerol con una cadena insaturada, como es el caso del POG, pueda ser un

mejor promotor del enlace a membrana de la PKC α que una molécula totalmente saturada como ocurre con el DPG.

En conclusión, se han caracterizado las propiedades físicas de mezclas lipídicas formadas por diferentes fosfolípidos que comparten una cadena acílica saturada y otra insaturada, que recuerdan a determinadas moléculas presentes en las membranas biológicas animales, con dos tipos de diacilglicerol: DPG y POG. Aunque ambos eran capaces de activar la PKC α , un doble mutante de la enzima incapaz de unir Ca²⁺ y fosfolípidos a través de su dominio de unión C2 se activó por POG pero no por DPG. Esto demuestra que los diacilglicerol con cadenas acílicas insaturadas son capaces de promover la activación y el enlace de la enzima independientemente de Ca²⁺ y de fosfatidilserina, aunque la presencia de estos dos ligandos facilita enormemente la activación de la misma.

Capítulo IV

Parámetros de activación de los dominios C2 de la PKC α , β II y γ .

1. RESUMEN.

El dominio C2 se encuentra presente en numerosas proteínas y sirve como punto inicial de la regulación de un gran número de rutas o vías de señalización celular mediante su anclaje a la membrana dependiente de Ca^{2+} . En este trabajo se utilizó la espectroscopia fluorescencia para llevar a cabo una comparación acerca de las afinidades por los principales ligandos característicos de este tipo de dominios C2 (Ca^{2+} y fosfolípidos aniónicos), entre tres miembros de la subfamilia de las PKCs clásicas, en concreto las isoenzimas α , β II y γ . Los resultados revelaron que, a pesar del hecho de que estas isoenzimas se encuentran estrechamente relacionadas entre sí y que presentan algunas similitudes en su comportamiento, sus dominios C2 están bastante especializados, lo que se deduce, por ejemplo, de la existencia de afinidades diferentes para el Ca^{2+} y los fosfolípidos aniónicos. Así, en ausencia de membranas, la afinidad de estos dominios C2 por Ca^{2+} fue similar y el coeficiente de Hill indicó que la unión de este ligando fue cooperativa, al menos en los casos de las isoenzimas α y γ . En cambio, en presencia de membranas con fosfatidilserina, la afinidad por Ca^{2+} aumentó, oscilando entre el nivel sub-micromolar y micromolar ($[\text{Ca}^{2+}]_{1/2} = 0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la PKC α , $0,53 \pm 0,01 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la PKC β II y $6,52 \pm 0,10 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la PKC γ) y observándose unión cooperativa en todos los casos. Este gran efecto observado sobre la afinidad por Ca^{2+} en presencia de membranas refleja un equilibrio de unión a membrana que está asociado al Ca^{2+} , así como el papel importante y directo del fosfolípido sobre la estabilización del Ca^{2+} unido.

Por otro lado, la afinidad y cooperatividad de la unión de los tres dominios C2 a membranas con fosfatidilserina en presencia de Ca^{2+} fueron también diferentes para los tres dominios. En este caso, el dominio C2 de la PKC γ necesitaría una mayor concentración de Ca^{2+} para promover su anclaje a la membrana.

De esta forma y aunque estos tres dominios C2 son muy similares, ya que guardan un elevado grado de homología de secuencia (el 64% de los residuos son idénticos) y de estructura tridimensional, se observan diferencias en la afinidad y cooperatividad de la unión por ligandos, demostrando así que están especializados para sus funciones y contextos celulares particulares.

2. INTRODUCCIÓN.

El Ca^{2+} es un segundo mensajero universal en células eucariotas y regula una amplia variedad de rutas de señalización como puede ser la fertilización, la transcripción de genes, la división y diferenciación celular, la contracción muscular, la señalización neuronal, la inflamación o la muerte celular programada, entre otras (Berridge y col., 1998; Spitzer y col., 2000). El Ca^{2+} responsable de desencadenar esta diversa señalización está regulado a nivel celular de manera precisa en el espacio, tiempo y concentración (Berridge y col., 1998). En conjunto, estas variables están optimizadas para crear distintas señales de Ca^{2+} que pueden coexistir incluso en el mismo tipo celular, pero que están altamente especializadas para la activación de distintas rutas en función de la señal extracelular que actúe. Por otro lado, las proteínas citoplasmáticas responsables de detectar, interpretar y propagar esta señal de Ca^{2+} deben estar igualmente especializadas. Así, en particular, los parámetros de la unión y activación por Ca^{2+} de una determinada proteína deben estar finamente coordinados para detectar las propiedades espaciales y temporales de la señal de Ca^{2+} y desencadenar una respuesta apropiada (Falke y col., 1994; Nalefski y Newton, 2001).

El dominio C2 es un motivo de anclaje a membrana que se encuentra presente en un amplio rango de proteínas reguladas por este segundo mensajero (Nalefski y Falke, 1996; Rizo y Südhof, 1998). Los dominios C2 modelan unen múltiples iones Ca^{2+} y entonces se anclan a membranas intracelulares específicas, permitiendo así regular puntos importantes en las distintas rutas de señalización (Hurley y Misra, 2000). Existen, al menos, cinco familias de proteínas intracelulares que contienen dominios C2: (i) las proteínas quinasas que fosforilan otras proteínas diana asociadas a membranas, (ii) las enzimas modificadoras de fosfolípidos que activan o inactivan segundos mensajeros derivados de lípidos, (iii) las proteínas de fusión y diana de vesículas, (iv) las proteínas activadoras de GTPasas y (v) las enzimas de ubiquitinación que marcan proteínas de membrana para su degradación (Nalefski y Falke, 1996; Rizo y Südhof, 1998). Se conoce la estructura tridimensional de muchos dominios C2, como el de la fosfolipasa A2 citosólica (Sutton y col., 1995; Perisic y col., 1998; Xu y col., 1998; Dessen y col., 1999), el de la sinaptotagmina (Sutton y col., 1995; Shao y col., 1998; Sutton y col., 1999), el de la fosfolipasa C δ (Essen y

col., 1996; Grobler y col., 1996), el de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998), el de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002), el de la PKC δ (Papa y col., 1998), el de la PKC ϵ (Ochoa y col., 2001), el de la proteína PTEN (Lee y col., 1999) y el de la PI3K (Walker y col., 1999), entre otros. Todos estos dominios C2 comparten una estructura en sándwich β compuesta por dos hojas β antiparalelas, con cuatro cadenas cada una y tres lazos intercatenarios en uno de los extremos del dominio que se encuentran implicados en la unión de Ca^{2+} y fosfolípidos. Las estructuras terciarias conocidas son muy similares a pesar de que el nivel de homología de secuencia de todos los dominios C2 no es muy alto (Nalefski y Falke, 1996). De hecho, la estructura primaria y la longitud de los lazos intercatenarios responsables de la unión de Ca^{2+} varían de una proteína a otra, como cabría esperar, por otro lado, de dominios relacionados entre sí pero especializados para diferentes rutas de señalización. Trabajos previos han caracterizado la dramática especialización de los dominios C2 de diferentes familias funcionales (Nalefski y Newton, 2001).

Para intentar descubrir la características de los dominios C2 implicadas en la regulación y especialización de las proteínas que los contienen, sería útil comparar dominios C2 que comparten una importante homología en cuanto a sus estructuras primaria y terciaria, siendo los candidatos idóneos las proteínas con dominios C2 incluidas dentro de una misma familia. En el caso de la PKC, existen tres subfamilias con, al menos, diez isoenzimas diferentes. La subfamilia de las PKCs clásicas (cPKC) incluye las isoformas α , β I, β II y γ , las cuales son candidatos susceptibles de comparación como proteínas relacionadas con dominios C2 homólogos. *In vitro*, la PKC α , la PKC β y la PKC γ fosforilan los mismos péptidos naturales diana de forma similar (Hoffmann, 1997). De cualquier modo, las pruebas obtenidas *in vivo* indican que existe un elevado grado de especialización funcional, como se puede observar en revisiones sobre la regulación de PKC (Newton, 2001). Los niveles de expresión normales de las isoenzimas clásicas de la PKC dan una indicación sobre esta especialización, ya que mientras la PKC α se encuentra en todos los tipos celulares, la PKC β aparece sólo en determinados tipos celulares y la PKC γ sólo en cerebro (Nishizuka, 1995). Se cree que esta sobreexpresión de la PKC α contribuye a la transformación y proliferación de células malignizadas. Por otro lado, la PKC β se utiliza como marcador de ciertos tipos de cáncer y su sobreexpresión ha sido

relacionada con fallos cardíacos y complicaciones cardiovasculares en diabéticos (Cornford y col., 1999; Dean y col., 1996; Bowling y col., 1999; Wakasaki y col., 1997). Finalmente, la PKC γ ha sido relacionada con el desarrollo de dolor persistente relacionado con las lesiones (Basbaum, 1999; Martin y col., 2001). Otro dato indicativo de la especialización de las isoenzimas de la PKC lo constituye sus diferentes implicaciones con el cáncer (Hofmann, 2001). Otro estudio que demuestra la especialización *in vivo* para estas isoenzimas, revela que la isoenzima clásica de la PKC que se activa inicialmente en ratas mediante angiotensina II cambia entre la α , la β y la γ , dependiendo de la edad del animal (Boesch y Garvin, 2001). Por otro lado, también se puede observar cierto grado de especialización mediante el estudio de las interacciones proteicas entre las PKCs y las quinasas C activadas por receptor o RACKs (Csukai y Mochly-Rosen, 1999). De esta forma, hasta la fecha se han identificado dos RACKs, el RACK1 y el β' -COP (Ron y col., 1994; Csukai y col., 1997), los cuales unen PKC β y PKC ϵ , respectivamente. Así, se ha localizado un sitio de unión para RACKs en los lazos de unión a Ca^{2+} 1 y 2 y en la cadena 4 de la PKC β , utilizando péptidos basados en esas regiones (Ron y col., 1995). Por otro lado, la región V5 de PKC β II ha sido relacionada también con la unión a RACK (Stebbins y Mochly-Rosen, 2001).

Los dominios C2 de las isoenzimas α , β II y γ de la PKC son idénticos en un 64% en su secuencia primaria de aminoácidos (Figura IV.1) (Knopf y col., 1986; Ono y col., 1988a; Housey y col., 1988; Kohout y col., 2002). Además, si consideramos en esta comparación de la secuencia primaria de aminoácidos no sólo a los residuos idénticos, sino también a los residuos homólogos, la similitud aumenta hasta más de un 82%. Más aún, las estructuras tridimensionales conocidas de los dominios C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998) presentan tan sólo una desviación de 0.43 Å entre átomos C α equivalentes (Figura IV.2). El dominio C2 de la PKC α ha sido cocrystalizado además con dos análogos lipídicos de fosfatidilserina de cadena corta (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002), revelando que los oxígenos lipídicos se coordinan directamente con uno o más de los iones Ca^{2+} unidos, de forma que se demuestra, por lo tanto, que el fosfolípido puede tener un papel importante en la unión de Ca^{2+} , así como que el Ca^{2+} actúa como puente en la unión del dominio C2 a la membrana.

		β 1	β 2	CBR1	β 3		
C2 α	157	EKR GRIYLKAEV-T D	EKLHVTYRDAK	NLIPMDPNGLS	DPYVKLKLI	PDPKNESK	
C2 β _{II}	157	ERR GRIYIQAHI-D R	EVLIVVYRDAK	NLVPMDPNGLS	DPYVKLKLI	PDPKSES K	
C2 γ	157	ERR GRLQLEIRAPTS D	E-IHITVGEAR	NLIPMDPNGLS	DPYVKLKLI	PDPRLNLT K	
		β 4	CBR2	β 5	β 6	CBR3	β 7
C2 α	210	QKT KTIRSTLN	PQWNESFTFKL	KPSDKD	RRLSVEIWDW	DRTTRN	DFMGSL5FGV
C2 β _{II}	210	QKT KTIKCSLN	PEWNETFRFQL	KESDKD	RRLSVEIWDW	DLTSRN	DFMGSL5FGI
C2 γ	210	QKT KTVKATLN	PVWNETFVFNL	KPGDVE	RRLSVEVWDW	DRTSRN	DFMGAM5FGV
		α 1	β 8	α 2			
C2 α	264	SELMK MP	ASGWYKL LN	QEEG EYYNVP	IPEG	293	
C2 β _{II}	264	SELQK AG	VDGWFKL LS	QEEG EYFNVP	VPPEG	294	
C2 γ	264	SELLK AP	VDGWYKL LN	QEEG EYYNVP	VADADNCS	297	

Figura IV.1. Alineación de las secuencias aminoacídicas de los dominios C2 aislados de PKC α , PKC β II y PKC γ . Las hojas β , las hélices α y los regiones de unión a Ca²⁺ se muestran de acuerdo con las asignaciones de las estructuras tridimensionales de los dominios C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998). La mayor diferencia entre estas dos estructuras tridimensionales reside en la zona de las hojas β 4 y β 5, las cuales son de mayor tamaño en el caso del dominio C2 de PKC β I. Los cuadros amarillos indican residuos idénticos, mientras que los residuos homólogos están resaltados en azul. Los residuos que participan en la coordinación de Ca²⁺ según las estructuras cristalinas aparecen resaltados en rojo.

Cabe destacar el hecho de que las estructuras tridimensionales disponibles presentan variabilidad en cuanto al número de iones Ca²⁺ que aparecen unidos al dominio C2, yendo de dos a tres para el dominio C2 de la PKC α y tres para el dominio C2 de la PKC β . Así, la estequiometría real de Ca²⁺ para los dominios C2 de la PKC unidos a membranas aún permanece indeterminada (Sutton y Sprang, 1998; Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). Más aún, las interacciones específicas entre los iones Ca²⁺ unidos a los grupos de cabeza lipídicos en la superficie de la membrana se complementan con interacciones electrostáticas no específicas que ayudan a estabilizar el estado unido a membrana del complejo proteína-Ca²⁺ (Murray y Honig, 2002). Aunque no hay información estructural disponible sobre el dominio C2 de la PKC γ , el alto nivel de homología de secuencia las otras isoenzimas de la familia de las PKCs clásicas, parece indicar que el dominio C2 de PKC γ debe presentar una estructura similar. En concreto, el dominio C2 de la PKC γ presenta una homología de secuencia del 73% y 67% comparado con los dominios C2 de la PKC α

y de la PKC β , respectivamente (Knopf y col., 1986; Ono y col., 1988a; Housey y col., 1988).

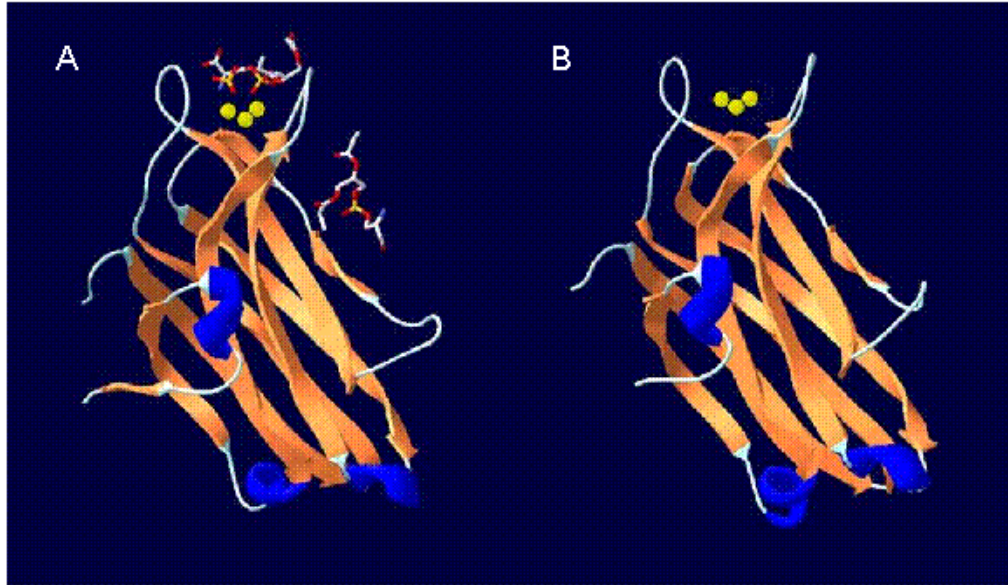


Figura IV.2. Estructuras tridimensionales de los dominios C2 aislados de la PKC α y la PKC β I obtenidas por difracción de rayos-X. Se muestra la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α (A) en presencia de Ca $^{2+}$ y del fosfolípido de cadena corta 1,2-diacetil-*sn*-fosfatidil-L-serina (DAPS) (Ochoa y col., 2002) y la del dominio C2 de la PKC β I (B) en presencia de Ca $^{2+}$ (Sutton y Sprang, 1998). Las hélices α se muestran en color azul, mientras que las hojas β aparecen en naranja. Los iones Ca $^{2+}$ se muestran en color amarillo.

En este trabajo, se realizó una comparación entre los dominios C2 de las isoenzimas α , β II y γ de las PKCs clásicas para calcular sus afinidades en el enlace de Ca $^{2+}$ en estado libre o en estado unido a membrana, así como las afinidades por la propia membrana y, de esta forma, poder determinar si estos dominios presentan especialización funcional. Utilizando fluorescencia de estado estacionario y transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), se analizaron el equilibrio y los parámetros cinéticos de la unión de Ca $^{2+}$ y membranas para cada dominio C2 aislado. Los resultados demuestran que incluso estos dominios C2 estrechamente relacionados pertenecientes a una misma subfamilia de proteínas pueden presentar parámetros de activación por Ca $^{2+}$ diferentes y especializados.

3. RESULTADOS.

3.1. Unión de Ca²⁺ a los dominios C2 en ausencia de membranas.

Para determinar las afinidades de unión a Ca²⁺ de los tres dominios C2 en ausencia de membranas se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia en equilibrio analizando la fluorescencia intrínseca de los residuos de Trp presentes en las proteínas y se observaron los cambios en la emisión de fluorescencia de dicho residuo debido a la unión de Ca²⁺. Los tres dominios C2 presentan cuatro Trp conservados en la estructura primaria: Trp223, Trp245, Trp247 y Trp274. Los residuos Trp245 y Trp247 se encuentran muy próximos a uno de los lazos intercatenarios (CBR3) que establecen coordinaciones con Ca²⁺ y fosfolípidos (Verdaguer y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2002; Ochoa y col., 2002).

Cada dominio C2 se sometió a una titulación con concentraciones crecientes de Ca²⁺ y las curvas de variación de fluorescencia intrínseca del Trp resultantes (Figura IV.3) se sometieron a un ajuste mediante el modelo teórico de un sitio independiente o bien el modelo de Hill. El mejor ajuste vino determinado por el coeficiente χ^2 .

Los datos experimentales de los tres dominios C2 se ajustaron mejor al modelo de Hill, caracterizado por unos valores estimados de $[Ca^{2+}]_{1/2}$ de $75,86 \pm 1,44$ μ M para el dominio C2 de la PKC α , $30,85 \pm 0,81$ μ M para el dominio C2 de la PKC β II y $49,23 \pm 3,20$ μ M para el dominio C2 de la PKC γ , y con unos índices de Hill (H) de $1,72 \pm 0,05$ para el dominio C2 de la PKC α , $1,08 \pm 0,03$ para el dominio C2 de PKC β II y $1,47 \pm 0,11$ para el dominio C2 de la PKC γ (Tabla IV.1). Estos valores del coeficiente de Hill indican que la unión de Ca²⁺ era claramente cooperativa para los dominios C2 de la PKC α y la PKC γ . En el caso del dominio C2 de la PKC β II, la cooperatividad fue baja o nula. De hecho, los ajustes obtenidos utilizando el modelo de unión a un solo sitio fueron peores para los dominios C2 de las isoenzimas de la PKC α y la PKC γ (datos no mostrados), mientras que para el dominio C2 de la PKC β II los resultados obtenidos fueron similares a los anteriores ($K_d = 32,45 \pm 1,19$ μ M). La falta de cooperatividad en la unión de Ca²⁺ en ausencia de membranas al dominio C2 de la PKC β II sugiere que dicho proceso está dominado

por un solo e independiente ión Ca^{2+} , mientras que para los dominios C2 de la PKC α y la PKC γ se unen, al menos, dos iones Ca^{2+} con cooperatividad positiva.

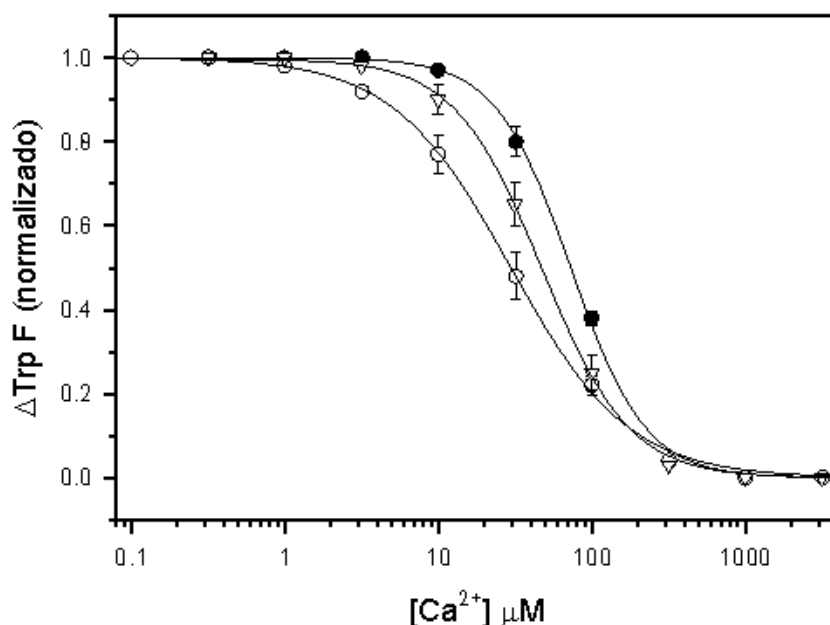


Figura IV.3. Afinidad por Ca^{2+} de los distintos dominios C2 de las PKCs clásicas. Se llevaron a cabo las valoraciones de los dominios C2 (5 μM) de la PKC α (●), la PKC βII (○) y la PKC γ (▽) en sus tampones correspondientes (Hepes 25 mM pH 7,4 y NaCl 100 mM para el dominio C2 de la PKC α ; MOPS 20 mM pH 6,8 y NaCl 100 mM para el dominio C2 de la PKC βII ; Tris-HCl 25 mM pH 8,0 y NaCl 100 mM para el dominio C2 de la PKC γ), con Ca^{2+} estándar a 25°C. Estos experimentos de fluorescencia en equilibrio se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia FluroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba, Edison, NJ, E.E.U.U). La anchura de las ventanas de excitación y emisión fue de 2 y 4 nm respectivamente para todos los experimentos de fluorescencia llevados a cabo. La unión de Ca^{2+} a los dominios C2 aislados se determinó mediante la variación de la fluorescencia intrínseca del Trp, representada de manera normalizada al valor máximo, en función de la concentración de dicho ión. La fluorescencia intrínseca del Trp se determinó utilizando una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 284 nm y se recogió la emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 340 nm (λ_{em}). Para controlar la atenuación de la fluorescencia del Trp, se realizaron diferentes controles. Se analizó una cubeta con el dominio C2 aislado por separado donde se añadieron los mismos volúmenes de tampón en lugar de ligando. Asimismo, se analizó otra cubeta con tampón donde se añadieron las diferentes concentraciones de Ca^{2+} para así determinar el efecto de dilución de la muestra. De esta forma, el control de la atenuación del Trp seguido de la corrección de la dilución de la muestra fueron sustraídos de los datos de la titulación de la proteína con Ca^{2+} . Se muestran los valores medios con su desviación estándar de tres experimentos independientes. Las curvas reflejan los mejores ajustes de los datos a la ecuación de Hill. Los valores derivados de los ajustes de los datos se reflejan en la Tabla IV.1.

En general, los valores de la afinidad por Ca^{2+} de los tres dominios C2 en ausencia de membranas fueron similares (Tabla IV.1). No obstante, curiosamente,

fue el dominio C2 de la PKC β II el que presentó una mayor afinidad, lo cual quizás esté relacionado con el hecho de que a este dominio se uniría un solo ión Ca²⁺, mientras que en los otros casos se unen varios iones Ca²⁺ y la constante obtenida representaría una visión global del proceso completo.

Tabla IV.1. Valores de los parámetros de unión a Ca²⁺ de los dominios C2 de la PKC α , la PKC β II y la PKC γ , obtenidos mediante medidas de fluorescencia.

Dominio C2	Unión de Ca ²⁺ intrínseca		Unión de Ca ²⁺ en presencia de membranas	
	[Ca ²⁺] _{1/2} (μ M)	Coef. Hill (H)	[Ca ²⁺] _{1/2} (μ M)	Coef. Hill (H)
PKC α	75,86 \pm 1,44	1,72 \pm 0,05	0,14 \pm 0,01	1,25 \pm 0,04
PKC β II	30,85 \pm 0,81	1,08 \pm 0,03	0,53 \pm 0,01	1,20 \pm 0,03
PKC γ	49,23 \pm 3,20	1,47 \pm 0,11	6,52 \pm 0,10	7,01 \pm 0,77

3.2. Unión de Ca²⁺ a los dominios C2 en presencia de membranas.

La afinidad en la unión del Ca²⁺ a los dominios C2 en presencia de las membranas se calculó mediante la cuantificación de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre los Trp intrínsecos de las proteínas, los cuales actuarían como donantes, y los fluoróforos dansilo presentes en las vesículas lipídicas preparadas, que actuarían como aceptores de la transferencia de energía.

Las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) utilizadas contenían una mezcla de fosfatidilcolina (POPC) y fosfatidilserina (POPS), así como una pequeña cantidad de fosfatidiletanolamina marcada con dansilo (d-PE). Las mezclas preparadas contenían la relación molar (POPC/POPS/d-PE) 35:60:5. La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia implica la proximidad entre el fluoróforo donante y el aceptor, de forma que, en nuestro caso, la señal observada proviene de la interacción del dominio C2 con la membrana. En ausencia de Ca²⁺ no se observa señal de transferencia de energía, lo cual indica que los dominios C2 tienen una nula o baja afinidad por la membrana antes de unir Ca²⁺.

Los datos resultantes de transferencia de energía de la proteína a la membrana se calcularon como se explicó ampliamente en el Capítulo II de esta memoria y se representaron, normalizados en función de la transferencia de energía máxima, frente a la concentración de Ca^{2+} libre (Figura IV.4).

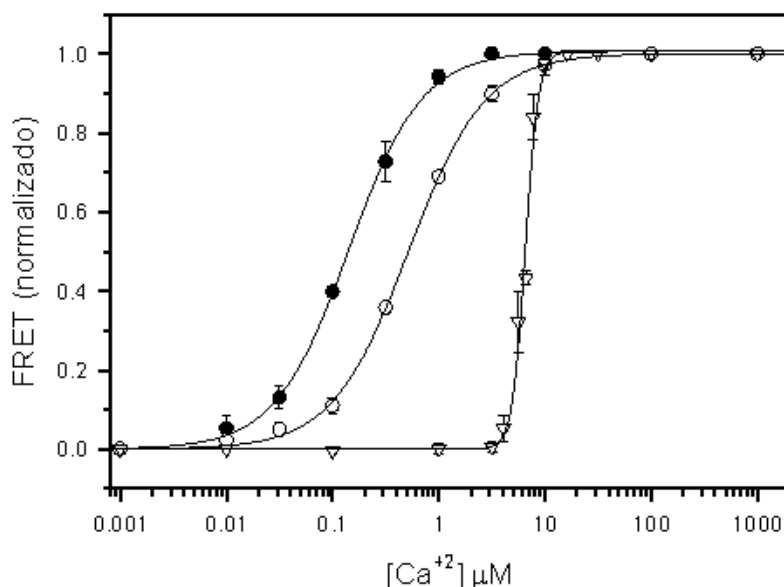


Figura IV.4. Afinidad por Ca^{2+} de los distintos dominios C2 de las PKCs clásicas en presencia de membranas. Se llevaron a cabo las valoraciones de los dominios C2 ($5 \mu\text{M}$) de la $\text{PKC}\alpha$ (\bullet), la $\text{PKC}\beta\text{II}$ (\circ) y la $\text{PKC}\gamma$ (∇) en sus tampones correspondientes (Hepes 25 mM pH $7,4$ y NaCl 100 mM para el dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$; MOPS 20 mM pH $6,8$ y NaCl 100 mM para el dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$; Tris-HCl 25 mM pH $8,0$ y NaCl 100 mM para el dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$), con Ca^{2+} estándar a 25°C y en presencia de SUV compuestas por POPC/POPS/d-PE ($35:60:5$, 1 mM), a 25°C . La unión de Ca^{2+} a los dominios C2 aislados en presencia de estas membranas se determinó mediante la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) desde el Trp a la molécula de d-PE de las vesículas. Estos experimentos se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia FluoMax-3 (Jobin Yvon, Horiba, Edison, NJ, E. E. U. U.). La anchura de las ventanas de excitación y emisión fue de 2 y 4 nm respectivamente. La transferencia de energía se analizó, en este caso, como la atenuación de la fluorescencia del Trp, utilizando una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 284 nm y una longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 340 nm . Al igual que en el caso anterior, se llevaron a cabo diversos controles de atenuación de la fluorescencia del Trp y de dilución de la muestra, los cuales se tuvieron en cuenta para la sustracción de los valores obtenidos con la titulación con Ca^{2+} . Se muestran los valores medios con su desviación estándar de tres experimentos independientes. Las curvas resultantes se sometieron al mismo análisis de mínimos cuadrados no-lineal comentado anteriormente. Las curvas reflejan los mejores ajustes de los datos normalizados a la ecuación de Hill. Los valores derivados de los ajustes de los datos se reflejan en la Tabla IV.1.

Estas representaciones se ajustaron mejor al modelo de Hill. Los valores obtenidos de $[\text{Ca}^{2+}]_{1/2}$ fueron $0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$, $0,53 \pm 0,01 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ y $6,52 \pm 0,10 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ (Tabla IV.1). Así, como se puede observar, en todos los casos la afinidad

por Ca^{2+} aumentó en gran medida con respecto a la situación de ausencia de membranas anteriormente comentada. Las diferencias en la afinidad fueron importantes, de forma que el dominio C2 de la PKC α fue el que presentó una mayor afinidad por Ca^{2+} en presencia de fosfolípido, mientras que el dominio C2 de PKC γ mostró la menor afinidad. La afinidad del dominio C2 de la PKC α por Ca^{2+} en presencia de membranas fue unas 4 veces mayor respecto al dominio C2 de la PKC β II y casi 50 veces respecto al dominio C2 de la PKC γ .

Los coeficientes de Hill (H) ajustados fueron $1,25 \pm 0,04$ para el dominio C2 de la PKC α , $1,20 \pm 0,03$ para el dominio C2 de la PKC β II y $7,01 \pm 0,77$ para el dominio C2 de la PKC γ (Tabla IV.1). Estos coeficientes indican que se observó cooperatividad en todos los casos, de forma que la unión a membrana podría estar dirigida por la incorporación de múltiples iones Ca^{2+} con cooperatividad positiva. Cabe destacar la elevada cooperatividad obtenida en el caso del dominio C2 de la PKC γ , lo cual podría estar relacionado con una posible mayor rapidez en la respuesta de este dominio respecto a la señal de Ca^{2+} *in vivo*.

Claramente, la membrana tiene un efecto significativo en la unión del Ca^{2+} a los dominios C2, aumentando la afinidad de los dominios por Ca^{2+} y modificando la cooperatividad de la unión, sobre todo para el caso del dominio C2 de la PKC β II, el cual presentaba una baja o nula cooperatividad en la unión a Ca^{2+} en ausencia de membranas.

3.3. Unión de lípidos a los dominios C2 en presencia de Ca^{2+} .

Para una mayor profundización en el estudio de la unión de los dominios C2 a las membranas, se determinó la afinidad de esta interacción en presencia de Ca^{2+} . De igual forma que en el anterior apartado, se analizó la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) desde el Trp de la proteína a la molécula de dansilo (d-PE) presente en la membrana para cada dominio C2 en presencia de Ca^{2+} . Se prepararon vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con la misma composición que la utilizada en el apartado anterior (POPC/POPS/d-PE, relación molar 35:60:5). Estas vesículas se añadieron a cada dominio C2 aislado en presencia de dos

concentraciones diferentes de Ca^{2+} , las cuales fueron seleccionadas según los resultados de la interacción de Ca^{2+} con los dominios en presencia de vesículas obtenidos previamente. De esta manera, se escogió una concentración de Ca^{2+} alta y saturante para todos los dominios C2 según los datos previos ($200 \mu\text{M Ca}^{2+}$, Figura IV.5A) y otra concentración intermedia menor que la anterior ($5,6 \mu\text{M Ca}^{2+}$, Figura IV.5B). Los resultados obtenidos se representaron normalizados en función de la concentración de POPS accesible (teniendo en cuenta el porcentaje de POPS en la mezcla y que sólo la capa externa de la vesícula fosfolipídica es la que puede interactuar con la proteína), dado que se ha demostrado que el dominio C2 interacciona con fosfolípidos aniónicos (Newton y Keranen, 1994). Estas curvas se sometieron al mismo análisis de mínimos cuadrados no-lineal comentado anteriormente y se ajustaron mejor al modelo de Hill. Los resultados finales fueron muy diferentes en las dos condiciones analizadas.

Así, en presencia de una alta concentración de Ca^{2+} ($200 \mu\text{M Ca}^{2+}$), los datos resultantes de la transferencia de energía desde la proteína a la membrana se ajustaron mejor al modelo de Hill (Figura IV.5A), a pesar de que se obtuvieron resultados similares utilizando el modelo de unión a un solo sitio con los datos de los dominios C2 de $\text{PKC}\alpha$ y $\text{PKC}\gamma$. Los mejores valores de $[\text{PS}]_{1/2}$ obtenidos fueron $5,25 \pm 0,69 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$, $12,23 \pm 0,54 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ y $5,06 \pm 0,64 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ (Tabla IV.2). Por otro lado, los mejores coeficientes de Hill (H) ajustados fueron $0,77 \pm 0,07$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$, $1,13 \pm 0,05$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ y $0,72 \pm 0,05$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ (Tabla IV.2). Estos coeficientes indican que no existió cooperatividad en la unión de lípido a los dominios C2 en estas condiciones experimentales, salvo quizás en el caso del dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ donde, de haber cooperatividad, ésta sería muy débil. Curiosamente, el dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ fue el que menor afinidad por lípido presentó bajo estas condiciones de ensayo, a pesar de que las constantes obtenidas para los tres dominios fueron muy similares. En este caso, y dado que, según los resultados anteriores en presencia de esta concentración de Ca^{2+} , los tres dominios estarían prácticamente saturados con el ión, la unión a la membrana parece ocurrir de una forma relativamente similar, sin grandes diferencias, para los tres dominios C2 y tendría lugar una vez que ha ocurrido la incorporación de Ca^{2+} .

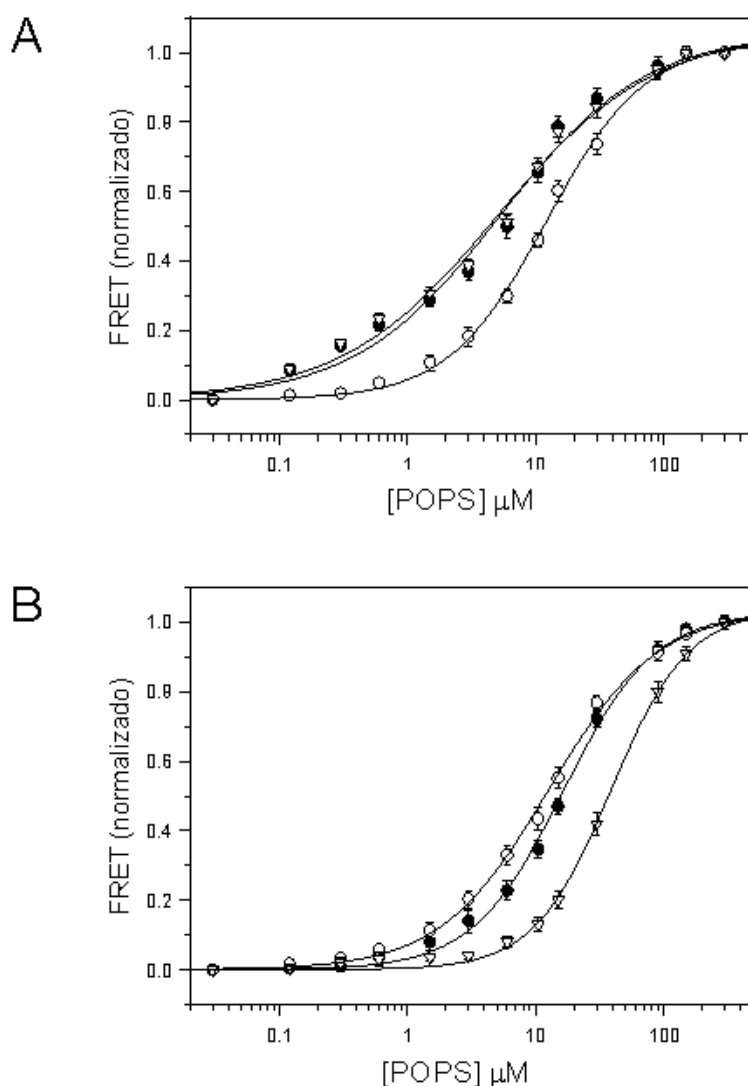


Figura IV.5. Afinidad por POPS de los distintos dominios C2 de las PKCs clásicas en presencia de diferentes cantidades de Ca^{2+} . Se llevaron a cabo las valoraciones con SUV de POPC/POPS/d-PE (35:60:5) en disoluciones con los dominios C2 (5 μM) de la PKC α (\bullet), la PKC β II (o) y la PKC γ (∇) en sus tampones correspondientes (Hepes 25 mM pH 7,4 y NaCl 100 mM; MOPS 20 mM pH 6,8 y NaCl 100 mM; y Tris-HCl 25 mM pH 8,0 y NaCl 100 mM, respectivamente), en presencia de Ca^{2+} 200 μM (A) y Ca^{2+} 5,6 μM (B), a 25°C. La unión de SUV a los dominios C2 en presencia de Ca^{2+} se determinó mediante la transferencia de energía de fluorescencia desde el Trp a la molécula de d-PE. Estos experimentos se realizaron en un espectrofotómetro de fluorescencia FluroMax-3 (Jobin Yvon, Horiba, Edison, NJ, E.E.U.U). La anchura de las ventanas de excitación y emisión fue de 2 y 4 nm respectivamente. La transferencia de energía se analizó, de nuevo, como la atenuación de la fluorescencia del Trp, utilizando una longitud de onda de excitación (λ_{ex}) de 284 nm y una longitud de onda de emisión (λ_{em}) de 340 nm. Al igual que en los casos anteriores, se llevaron a cabo diversos controles de atenuación de la fluorescencia del Trp y de dilución de la muestra, los cuales se tuvieron en cuenta para la sustracción de los valores obtenidos con la titulación con SUV. Se muestran los valores medios con su desviación estándar de tres experimentos independientes. Las curvas resultantes se sometieron al mismo análisis de mínimos cuadrados no-lineal comentado anteriormente. Las curvas reflejan los mejores ajustes de los datos normalizados a la ecuación de Hill. Los valores derivados de los ajustes de los datos se reflejan en la Tabla IV.2.

En cambio, cuando se realizó el estudio en presencia de una baja concentración de Ca^{2+} ($5,6 \mu\text{M Ca}^{2+}$), los resultados arrojaron mayores diferencias. Con esta concentración de Ca^{2+} y en presencia de membranas, los dominios C2 de la $\text{PKC}\alpha$ y de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ estarían prácticamente saturados, mientras que en el caso del dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ nos encontraríamos justo en la zona de respuesta hacia la saturación (Figura IV.4). Los datos obtenidos de la transferencia de energía de la proteína a la membrana se representaron de nuevo normalizados frente a la concentración de POPS accesible y se ajustaron mejor al modelo de Hill (Figura IV.5B). Los valores de $[\text{PS}]_{1/2}$ fueron $11,50 \pm 0,76 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$, $12,65 \pm 0,68 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ y $38,93 \pm 1,67 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$. Estos valores son muy similares a los obtenidos en el caso anterior, en presencia de una concentración de Ca^{2+} elevada, salvo para el caso del dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ (Tabla IV.2), donde la afinidad aparece muy reducida (unas 8 veces menor). Por otro lado, los mejores coeficientes de Hill (H) fueron $1,23 \pm 0,06$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$, $1,03 \pm 0,05$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ y $1,44 \pm 0,06$ para el dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ (Tabla IV.2). Estos coeficientes indican que existía cooperatividad en el caso del dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ y en el de la $\text{PKC}\alpha$, siendo de mayor importancia para el primero. El dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ no mostró cooperatividad según estos resultados. Lo que parece ocurrir es que el dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ y, en menor medida, el dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$, estarían prácticamente saturados con Ca^{2+} en estas condiciones, por lo que la unión de a la membrana seguiría el mismo patrón que el comentado en el caso anterior. En cambio, el dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ en estas condiciones estaría parcialmente saturado con Ca^{2+} , de forma que la unión a la membrana se realizaría de forma cooperativa ya que se produciría a su vez la incorporación de más Ca^{2+} hasta llegar a la saturación. Por lo tanto, este coeficiente de Hill que indica cooperatividad en este caso sería un reflejo de la incorporación aditiva de Ca^{2+} y fosfolípido al dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$.

Claramente, la presencia de Ca^{2+} tiene un efecto esencial sobre la unión de los dominios C2 a la membrana, de manera que en ausencia de Ca^{2+} , no se produce unión. Asimismo, la diferente afinidad por Ca^{2+} de cada dominio C2 produce una diferente afinidad en la unión a la membrana, siendo todo esto una prueba de la alta especialización de los dominios C2 de estas proteínas.

Tabla IV.2. Valores de los parámetros de unión a POPS de los dominios C2 de la PKC α , la PKC β II y la PKC γ obtenidos mediante medidas de fluorescencia.

Dominio C2	Unión de POPS en presencia de Ca ²⁺ 200 μ M		Unión de POPS en presencia de Ca ²⁺ 5,6 μ M	
	[POPS] _{1/2} (μ M)	Coef. Hill (H)	[POPS] _{1/2} (μ M)	Coef. Hill (H)
PKC α	5,25 \pm 0,69	0,77 \pm 0,07	11,50 \pm 0,76	1,23 \pm 0,06
PKC β II	12,23 \pm 0,54	1,13 \pm 0,05	12,65 \pm 0,68	1,03 \pm 0,05
PKC γ	5,06 \pm 0,64	0,72 \pm 0,05	38,93 \pm 1,67	1,44 \pm 0,06

4. DISCUSIÓN.

Este estudio comparativo de los dominios C2 de la PKC α , la PKC β II y la PKC γ revela diferencias tanto sutiles como significativas entre ellos en cuanto a los parámetros de activación por Ca²⁺. Estos dominios presentan afinidades intrínsecas por Ca²⁺ similares, aunque se observa una mayor diferencia en la afinidad por Ca²⁺ en presencia de membranas, lo cual supone una situación más cercana a lo que se puede encontrar *in vivo* en el ambiente celular. Estos últimos resultados proporcionan una prueba importante de la especialización de los mecanismos de activación por Ca²⁺ de las PKCs clásicas. Estas diferencias pueden haber aparecido para modular la cooperatividad de la unión de Ca²⁺ en presencia de membranas, lo cual a su vez controlaría la sensibilidad de los dominios C2 frente a pequeños cambios en la concentración de Ca²⁺ citoplasmático.

Más aún, las diferencias observadas entre estos dominios C2 podrían servir para optimizar la actuación de estos dominios en su contexto proteico particular, ya que cada dominio C2 debe actuar de manera coordinada con los otros dominios especializados de su isoenzima concreta, el dominio C1 y el dominio catalítico (Newton, 2001; Hurley y Meyer, 2001). En particular, los dominios C1 y C2 de las PKCs clásicas presentan una unión a membrana aditiva (Johnson y col., 2000; Nalefski y Newton, 2001). Así, las afinidades aparentes por Ca²⁺ y por membranas

de las isoenzimas completas de PKC convencionales incluyen contribuciones de ambos dominios C1 y C2, debido al acoplamiento de las reacciones de unión a Ca^{2+} y a la membrana. Por tanto, para resolver las contribuciones reguladoras de los dominios C1 y C2 es necesario un estudio completo y cuantitativo de las características de unión a Ca^{2+} y a la membrana de los dominios C2 aislados.

4.1. Análisis comparativo de la secuencia primaria de aminoácidos y de la estructura tridimensional.

El análisis de la secuencia primaria de aminoácidos entre los dominios C2 de $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\beta_{\text{II}}$ y $\text{PKC}\gamma$ revela que el 64 % de sus residuos son idénticos (Figura IV. 1), lo cual indica que existe una homología considerable entre estos tres dominios, mucho mayor si consideramos además los residuos homólogos (más del 82%). Para identificar las posibles diferencias de la estructura primaria relacionadas con las diferentes afinidades de estos dominios C2 por un tercer ión Ca^{2+} , resulta útil centrarse en los tres lazos intercatenarios, denominados lazos o regiones de unión a Ca^{2+} 1-3 (CBR 1-3), los cuales han sido previamente implicados en la coordinación de Ca^{2+} y en los contactos directos con la superficie de la membrana para estos y otros dominios C2 (Perisic y col., 1998; Xu y col., 1998; Dessen y col., 1999; Sutton y col., 1995; Shao y col., 1998; Sutton y col., 1999; Essen y col., 1996; Grobler y col., 1996; Sutton y col., 1998; Verdaguer y col., 1999; Chae y col., 1998; Nalefski y Falke, 1998; Medkova y Cho, 1998b; Conesa-Zamora y col., 2001; Frazier y col., 2002).

Así, el CBR1 es idéntico para los dominios C2 de la $\text{PKC}\alpha$, la $\text{PKC}\beta_{\text{II}}$ y la $\text{PKC}\gamma$, excepto por un pequeño cambio entre aminoácidos homólogos, lo cual no parece correlacionarse con posibles diferencias en la estequiometría de unión para el Ca^{2+} .

Aunque en otros dominios C2 el CBR2 proporciona una coordinación directa con Ca^{2+} (Perisic y col., 1998; Xu y col., 1998; Dessen y col., 1999; Essen y col., 1996; Grobler y col., 1996), las estructuras tridimensionales de los dominios C2 de la $\text{PKC}\alpha$ (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y la $\text{PKC}\beta_{\text{I}}$ (Sutton y Sprang,

1998) revelan que no hay coordinación directa con este lazo. En el CBR2 de las isoenzimas clásicas de la PKC encontramos cuatro sustituciones, incluyendo una no conservada. En otros dominios C2, esta lazo juega también el papel menos importante en la unión a la membrana (Frazier y col., 2002; Ball y col., 1999). De cualquier forma, la Arg216 del CBR2 en el dominio C2 de la PKC α está reemplazada por Lys en los dominios C2 de la PKC β II y la PKC γ . Esta sustitución sí podría tener relación con las posibles diferencias en la estequiometría del Ca²⁺, de forma que la Arg216 podría ser la responsable de interacciones repulsivas con un ion Ca²⁺ que estarían reducidas en los otros casos debido al bajo pK_a de la Lys.

Finalmente, el CBR3 muestra dos sustituciones, siendo una de ellas entre aminoácidos homólogos. Así la Arg249 en el dominio C2 de la PKC α y la PKC γ es sustituida por Lys en el dominio C2 de la PKC β II. Por otro lado, la Thr251 en el dominio C2 de la PKC α es sustituida conservativamente por Ser en los dominios C2 de la PKC β II y la PKC γ . Esta sustitución podría estar relacionada también con la posible diferente estequiometría de Ca²⁺. Este residuo es crítico para el anclaje a membrana dependiente de Ca²⁺ y para la activación enzimática de la PKC α completa, ya que coordina directamente el tercer ión Ca²⁺ cuando está presente en la estructura tridimensional de los dominios C2 de la PKC (Sutton y Sprang, 1998; Ochoa y col., 2002; Conesa-Zamora y col., 2002). Mientras las diferencias entre las cadenas laterales de Thr y la Ser son sutiles, el grupo metilo extra de la Thr podría reducir significativamente la afinidad de la PKC α por un ión Ca²⁺ en el estado unido a membrana.

Aunque las posiciones 216 y 251 son los candidatos más probables donde atribuir las posibles diferencias en la estequiometría de estos dominios C2 por el Ca²⁺, sería necesario realizar estudios más profundos para poder identificar los verdaderos aspectos estructurales de este fenómeno.

Las estructuras tridimensionales obtenidas por difracción de rayos-X de los dominios C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998) muestran una alta similitud entre los mismos (Figura IV.2). A pesar de que la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC γ aún no ha sido resuelta, cabe esperar que este dominio adopte una conformación similar a los

otros dos debido a la elevada conservación de secuencia existente entre todos ellos. Tras solapar las estructuras tridimensionales de los dominios C2 de la PKC α y la PKC β I, se observó que las mayores diferencias residían a nivel del lazo de unión entre las hojas β 3 y β 4 y entre las hojas β 5 y β 6 (Figura IV.6). El primer caso corresponde a una zona cercana a la región de interacción con Ca²⁺ y fosfolípidos, mientras que el segundo es una región bastante alejada de la cara del dominio implicada en esta interacción. Estas ligeras diferencias en la estructura deben estar relacionadas con la distinta especialización fisiológica de cada una de las isoenzimas *in vivo*.

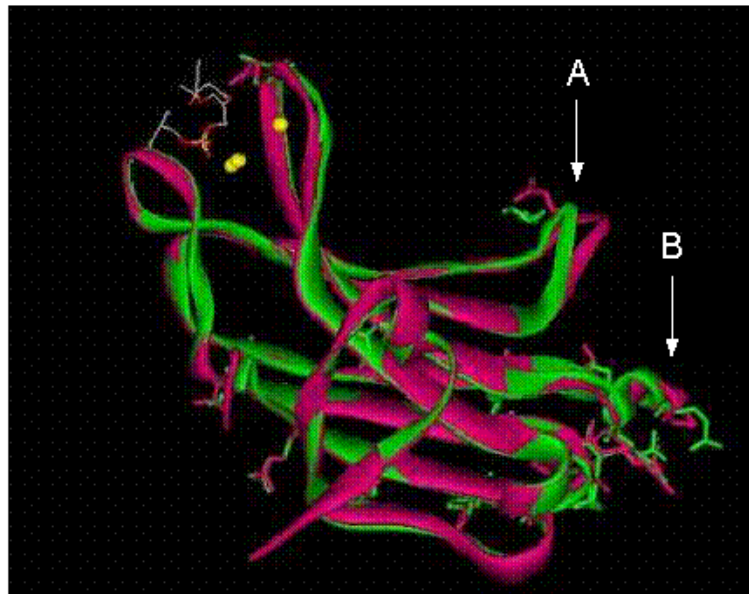


Figura IV.6. Solapamiento de las estructuras tridimensionales de los dominios C2 de la PKC α y la PKC β I. Las estructuras tridimensionales resueltas por difracción de rayos-X de los dominios C2 de la PKC α (en rosa) (Verdaguer y col., 1999) y la PKC β I (en verde) (Sutton y Sprang, 1998) mostraron una elevada similitud. Las mayores diferencias se observaron en la zona de unión de las cadenas β 3 y β 4 (A) y en la de las cadenas β 5 y β 6 (B) y vienen resaltadas por las flechas.

4.2. Afinidades y cooperatividad en la unión a Ca²⁺.

La unión de Ca²⁺ a los tres dominios generó un cambio en la fluorescencia intrínseca del Trp de igual signo, lo cual sugiere que esta unión genera un cambio ambiental similar en los cuatro residuos de Trp conservados de los tres dominios.

Los dominios C2 de la PKC α , la PKC β II y la PKC γ presentaron afinidades de unión a Ca²⁺ similares en ausencia de membranas. Asimismo, los coeficientes de Hill obtenidos mostraron cooperatividad en todos los casos, siendo este fenómeno mayor en el caso del dominio C2 de la PKC α ($H = 1,72 \pm 0,05$, en ausencia de membranas). Este valor está muy próximo al coeficiente de Hill esperado para la unión de dos iones Ca²⁺. Los otros dos dominios C2 también presentaron cooperatividad en la unión de Ca²⁺ en ausencia de membranas, por lo que el razonamiento sería similar. No obstante, en el caso del dominio C2 de la PKC β II se plantean dudas acerca de esta última hipótesis, debido al bajo valor del coeficiente de Hill obtenido.

Como cabría esperar de un equilibrio de unión acoplado, la presencia de membranas aumentó la afinidad aparente por Ca²⁺ de los tres dominios C2. El aumento de la afinidad fue distinto para cada dominio, siendo el dominio C2 de la PKC γ el que mostró una menor afinidad. El efecto de las membranas en la cooperatividad de la unión a Ca²⁺ también resultó diferente para los tres dominios C2, pues el valor obtenido para el dominio C2 de la PKC γ fue muy superior a los de los otros dos dominios, a pesar de que todos mostraron cooperatividad. Esto sugiere que, si bien en todos los casos el número de iones Ca²⁺ unidos en el estado de asociación a membrana es mayor que uno, el dominio C2 de la PKC γ es quien presenta una respuesta más rápida pero más limitada frente a pequeños cambios en la concentración de Ca²⁺. En el estado unido a membrana, los grupos de cabeza de los fosfolípidos podrían contribuir con sus oxígenos a la coordinación directa de Ca²⁺, tal y como se aprecia en la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α unido a fosfolípidos de cadena corta (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). Tales interacciones podrían aumentar la afinidad por los iones Ca²⁺ ya unidos, o incluso disparar la unión de iones Ca²⁺ adicionales al dominio unido a la membrana. De hecho, la unión de iones Ca²⁺ adicionales podría estar reflejada en el aumento de la cooperatividad que se observa para los tres dominios C2 en presencia de membranas. Ya que el dominio C2 de la PKC γ presenta los valores mayores de coeficiente de Hill y $[Ca^{2+}]_{1/2}$ en presencia de membranas, este dominio podría estar diseñado para ser activado a mayores concentraciones de Ca²⁺, a la vez que fuera sensible a menores cambios en la concentración de Ca²⁺ que los otros dos dominios.

Estos resultados son coherentes con el modelo previamente descrito anteriormente (Nalefski y Newton, 2001), donde se propone que dos iones Ca^{2+} se unen rápidamente al dominio aislado y entonces se produce el anclaje lento a la membrana y la unión del tercer ión Ca^{2+} . La capacidad de este dominio de unir hasta tres iones Ca^{2+} se apoya en estudios cristalográficos y de modelado (Ochoa y col., 2002), donde se revela que tres iones Ca^{2+} se unen al dominio libre en concentraciones milimolares. Tales niveles elevados de Ca^{2+} , necesarios para los procesos de cristalización pero sin relevancia fisiológica, serían capaces de conducir a la unión del tercer ión Ca^{2+} incluso en ausencia de membranas (Sutton y Sprang, 1998; Banci y col., 2002).

4.3. Afinidades y cooperatividad en la unión a membranas.

Los dominios C2 de la $\text{PKC}\alpha$, la $\text{PKC}\beta\text{II}$ y la $\text{PKC}\gamma$ presentaron diferentes afinidades de unión a lípidos en presencia de Ca^{2+} . Cuando se utilizó una concentración de Ca^{2+} alta, a la cual los tres dominios C2 se encontraban prácticamente saturados según los resultados anteriores, el comportamiento fue similar, en cuanto a afinidad y cooperatividad. En cambio, cuando se utilizó una concentración de Ca^{2+} baja, las diferencias fueron mayores. En este caso, las afinidades y cooperatividad por lípido para los dominios C2 de la $\text{PKC}\alpha$ y la $\text{PKC}\beta\text{II}$ se mantuvieron en el rango de los valores obtenidos en las condiciones anteriores, mientras que, en cambio, el dominio C2 de la $\text{PKC}\gamma$ presentó un comportamiento bastante diferente, con una afinidad que disminuyó unas ocho veces y una cooperatividad mucho mayor que en el caso anterior. Estos resultados sugieren, como en el caso anterior, que este dominio necesita mayores concentraciones de Ca^{2+} para su enlace a la membrana.

4.4. Implicaciones para la señalización *in vivo* de la PKC.

Estos resultados sugieren que las isoenzimas clásicas de la PKC pueden responder a diferentes niveles de Ca^{2+} en el ambiente celular. Estudios previos han medido valores de $[\text{Ca}^{2+}]_{1/2}$ para la activación de la actividad quinasa de la $\text{PKC}\alpha$ y

la PKC β completas (Bittova y col., 2001; Edwards y Newton, 1997b), aunque debido al uso de condiciones experimentales diferentes, no se pueden realizar comparaciones fiables acerca de estos parámetros. Así, es necesario que previamente a los estudios cuantitativos con las diferentes isoenzimas completas, se analicen las diferencias posibles entre sus dominios C2 que pudieran intervenir en el anclaje a la membrana. Si asumimos que los dominios C2 de las PKCs clásicas muestran interacciones equivalentes con las membranas, los parámetros de activación por Ca²⁺ medidos en este trabajo pueden predecir que una alta concentración de Ca²⁺ induciría el anclaje de los tres dominios de forma similar. En cambio, durante una pequeña señal de Ca²⁺, la PKC β II podría anclarse más eficientemente que la PKC γ , la cual a su vez se anclaría más eficientemente que la PKC α . Estos parámetros de activación tan diferentes se suponen necesarios para la especialización de las isoenzimas clásicas de la PKC en las distintas rutas de señalización celular.

Se observan incluso diferencias más dramáticas entre los dominios C2 de diferentes familias de proteínas. Los dominios C2 de las PKCs clásicas, de la sinaptotagmina I y de la fosfolipasa A2 citosólica presentan valores de [Ca²⁺]_{1/2}, cinéticas de unión y disociación a membranas y mecanismos de asociación a membrana muy variables (Nalefski y Newton, 2001). De todos estos dominios C2, los de la PKC α , la PKC β y la PKC γ presentan propiedades más similares al dominio C2A de la sinaptotagmina I, el cual también presenta un mecanismo de anclaje a membrana de tipo iónico y prefiere fosfolípidos aniónicos. No obstante, este dominio C2 se activa a concentraciones de Ca²⁺ significativamente más altas y posee una cinética de unión y disociación de la membrana significativamente más rápida que la de los dominios C2 de las PKCs clásicas (Kohout y col., 2002). Por el contrario, el dominio C2 de la fosfolipasa A2 citosólica presenta un mecanismo de anclaje a membrana de tipo hidrofóbico y prefiere fosfolípidos neutros, mostrando una cinética de unión y disociación de la membrana mucho más lenta que la de los dominios C2 de la sinaptotagmina I y de la PKC α , la PKC β y la PKC γ .

En algunos casos, el papel fisiológico de un dominio C2 proporciona una explicación simple de la elevada especialización de sus parámetros de activación. Por ejemplo, la alta concentración de Ca²⁺ necesaria para activar el dominio C2A de la sinaptotagmina I es compatible con los elevados flujos de Ca²⁺ que se producen en la

sinapsis. Por otro lado, la cinética de activación rápida de este dominio es consistente con el papel propuesto como mediador de la liberación de neurotransmisores (Brose y col., 1992). En otros casos, son necesarios estudios más profundos para aclarar las razones fisiológicas que subyacen a la evolución de la especialización de los distintos dominios C2.

Capítulo V

Análisis calorimétrico de los dominios C2 de la PKC α , β II y γ .

1. RESUMEN.

Se estudió la afinidad de los dominios C2 de las PKCs clásicas (α , β II y γ) por Ca^{2+} y vesículas lipídicas con POPS utilizando ITC y se analizó su estabilidad en presencia de diferentes concentraciones de estos ligandos mediante DSC.

El Ca^{2+} se une a los tres dominios C2 de forma similar, mostrando la presencia de un sitio de alta afinidad que enlazaría un ión Ca^{2+} de forma exotérmica y otro tipo de sitio de menor afinidad al que se unirían dos iones Ca^{2+} de forma endotérmica. Si bien el primer sitio presenta una constante de disociación (K_d) del orden de 1 μ M para los tres dominios, las mayores diferencias se observan en el segundo tipo de sitio, mostrando una afinidad por Ca^{2+} para el dominio C2 de la PKC γ unas cuatro veces mayor que la del dominio C2 de la PKC α y unas cinco veces mayor que la del dominio C2 de la PKC β II. En ausencia de Ca^{+2} , la unión de vesículas con POPS a los dominios C2 resultó ser de muy baja afinidad, por lo que sería necesaria la presencia de grandes concentraciones de vesículas para llegar a saturación. En cambio, en presencia de Ca^{2+} saturante, estas vesículas se unieron a los dominios C2 con elevada afinidad. En los tres casos, la unión de las vesículas a los tres dominios C2 fue exotérmica y los valores de las constantes de disociación para los dominios C2 de la PKC α y de la PKC γ fueron similares, aproximadamente el doble de la constante obtenida para el dominio C2 de la PKC β II.

Por otro lado, los estudios de la estabilidad térmica de los dominios en presencia de concentraciones crecientes de Ca^{2+} y vesículas lipídicas aportaron más información sobre la interacción de las proteínas con estos ligandos. Así, la unión de Ca^{2+} a los dominios C2 de la PKC α y PKC γ , los protegió frente a la desnaturalización térmica aumentando T_m de forma similar. La presencia de Ca^{2+} también aumenta el valor de T_m en el caso del dominio C2 de la PKC β II, pero en menor medida que a los otros dos dominios. La presencia de vesículas con POPS produjo un mayor aumento de T_m a las mismas concentraciones de Ca^{2+} , observándose las mayores diferencias con el dominio C2 de la PKC γ .

Estas diferencias observadas en la afinidad por ligandos y en la estabilidad entre los tres dominios C2 de la PKC α , la PKC β II y la PKC γ pueden estar relacionadas con el hecho de que las distintas isoenzimas de la PKC se encuentren muy especializadas en cuanto a su nivel de expresión y localización en cada tipo celular.

2. INTRODUCCIÓN.

Las isoenzimas clásicas de la PKC (Dekker y Parker, 1994; Nishizuka, 1995; Newton, 1997) se encuentran reguladas por DAG y ésteres de forbol, que se enlazan al dominio C1, y de forma cooperativa por Ca^{2+} y fosfolípidos aniónicos, en especial fosfatidilserina, los cuales interaccionan con el dominio C2 (Newton, 1995). Así, se ha comprobado que el dominio C2 de la PKC interviene en el anclaje de la proteína a la membrana dependiente de Ca^{2+} (Shao y col., 1996; Walker y col., 1999), el cual requiere fosfolípidos aniónicos (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002).

Mediante la resolución de su estructura tridimensional se han podido identificar los residuos implicados en la unión de Ca^{2+} y fosfolípidos a los dominios C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998). No obstante, aún no está claro el número exacto de iones Ca^{2+} que pueden interaccionar fisiológicamente con los dominios C2 de las PKCs clásicas, encontrándose hasta tres moléculas de Ca^{2+} en las estructuras tridimensionales de los dominios C2 de la PKC α y de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998; Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). Se ha demostrado que la presencia de membranas aumenta la afinidad general de los dominios C2 por Ca^{2+} , y que la presencia de Ca^{2+} potencia el anclaje a la membrana (Davletov y Sudh \ddot{o} f, 1993; Li y col., 1995; Shao y col., 1996; Nalefski y col., 1997; Perisic y col., 1998).

A pesar de que las isoenzimas clásicas de la PKC (α , β I, β II y γ) comparten propiedades estructurales y enzimáticas similares, se distribuyen en los diferentes tejidos y tipos celulares de forma específica y con distintos niveles de expresión (Ohno y col., 1991; Dekker y Parker, 1994; Dempsey y col., 2000). Así, la PKC α se encuentra en todos los tipos celulares, mientras que la PKC β I y la PKC β II aparecen sólo en algunos y la PKC γ es específica del sistema nervioso central (Nishizuka, 1992). Teniendo esto en cuenta, resulta muy interesante intentar aclarar la regulación de las distintas isoenzimas clásicas para poder explicar esta localización celular y nivel de expresión diferentes. Se escogieron los dominios C2 de estas isoenzimas de la misma subfamilia para llevar a cabo un estudio comparativo de su estabilidad térmica y de sus afinidades por Ca^{2+} y por membranas fosfolipídicas, ya que los

dominios C2 poseen un papel muy importante en la regulación de la actividad de las isoenzimas clásicas de la PKC.

Aunque la secuencia primaria de aminoácidos de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC se encuentra muy conservada (Kohout y col., 2002) y, lo que es más curioso, las estructuras tridimensionales de los dominios C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998) son muy similares, la elevada especialización de estas isoenzimas debería poder explicarse mediante algunas características concretas de su estructura y/o, en último término, mediante las distintas afinidades por los ligandos. A pesar de que no se dispone de información acerca de la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC γ , la elevada homología de secuencia respecto a los dominios C2 de la PKC α y PKC β sugiere que dicha estructura debería ser muy similar.

En este trabajo se han utilizado técnicas calorimétricas para analizar las diferencias en la afinidad por distintos ligandos de las distintas isoenzimas clásicas de la PKC, así como las diferencias en la estabilización de su estructura fruto de la interacción con dichos ligandos. La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC) son los únicos métodos disponibles para determinar los cambios en la entalpía de una proteína de forma directa (Jelesarov y Bosshard, 1999). Mediante el análisis de ITC se pueden obtener los parámetros termodinámicos de la interacción entre una proteína y un ligando. Estos parámetros son la constante de disociación (K_d), la estequiometría (n) y los cambios en la entalpía (ΔH) y en la entropía de la interacción (ΔS). Por otro lado, el estudio mediante DSC nos permite acceder directamente al mecanismo termodinámico que rige el equilibrio conformacional entre la forma nativa y la forma desnaturalizada de una proteína y puede ser utilizado para realizar el análisis de interacciones entre moléculas (Takahashi y Fukada, 1985; Shrake y Ross, 1990; Lin y col., 1994; Conejero-Lara y Mateo, 1996). La combinación de estas dos técnicas nos proporciona una descripción más completa de la termodinámica de un sistema. De esta forma, se han estudiado algunos dominios C2 de distintas proteínas mediante estas técnicas, como el dominio C2 de la fosfolipasa C δ 1 (Grobler y Hurley, 1998), el de la fosfolipasa A $_2$ citosólica (Xu y col., 1998), el de las fosfolipasas D α y D β (Zheng y col., 2000) o el de la PKC ϵ (García-García y col., 2001).

3. RESULTADOS.

3.1 Análisis de ITC.

3.1.1. Valoración de la unión de Ca^{2+} .

Se estudiaron y caracterizaron las propiedades termodinámicas de la unión de Ca^{2+} a los dominios C2 de tres isoenzimas clásicas de la PKC (α , βII y γ) mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), utilizando un microcalorímetro Microcal modelo MCS (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U). Wiseman y col. (1989) describieron detalladamente este equipo, así como su utilización. Se realizaron distintos ensayos para valorar la unión de este ión a los diferentes dominios C2 purificados. Los resultados obtenidos se ajustaron a varios modelos teóricos de interacción, siendo el *modelo de dos tipos de sitios de unión* el que mejor reprodujo las curvas de titulación de Ca^{2+} obtenidas.

La curva de valoración de la unión de Ca^{2+} al dominio C2 de la PKC α se muestra en la Figura V.1. El ajuste de los datos muestra la existencia de dos tipos de sitios, uno de alta afinidad (con una constante de disociación $K_d = 0,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$) y otro de baja afinidad (con una constante de disociación $K_d = 22,2 \pm 2,6 \mu\text{M}$) (Tabla V.1). Asimismo, mientras el primer tipo de sitio enlaza Ca^{2+} de manera exotérmica, con un cambio en la entalpía $\Delta H = -2,3 \pm 0,3 \text{ kcal/mol}$, el segundo tipo de sitio une Ca^{2+} de forma endotérmica, con un $\Delta H = +0,74 \pm 0,04 \text{ kcal/mol}$ (Tabla V.1). Por otro lado, mientras el número de moléculas unidas (n) al primer tipo de sitio fue $n_1 = 0,2 \pm 0,1$, para el segundo resultó ser $n_2 = 2,4 \pm 0,2$ (Tabla V.1). Estos últimos datos se pueden interpretar como que el sitio de alta afinidad liga presumiblemente una molécula de Ca^{2+} , mientras que el segundo tipo de sitio, de menor afinidad, une dos moléculas de Ca^{2+} .

El hecho de obtener un valor tan bajo en cuanto al número de moléculas para el sitio de alta afinidad puede deberse a varias razones. En primer lugar, es posible que este sitio, debido a su alta afinidad por Ca^{2+} , estuviera ya parcialmente saturado antes de comenzar la titulación, a pesar del tratamiento previo con una resina quelante de Ca^{2+} (Chelex-100) al que fueron sometidos tanto las proteínas como los utilizados.

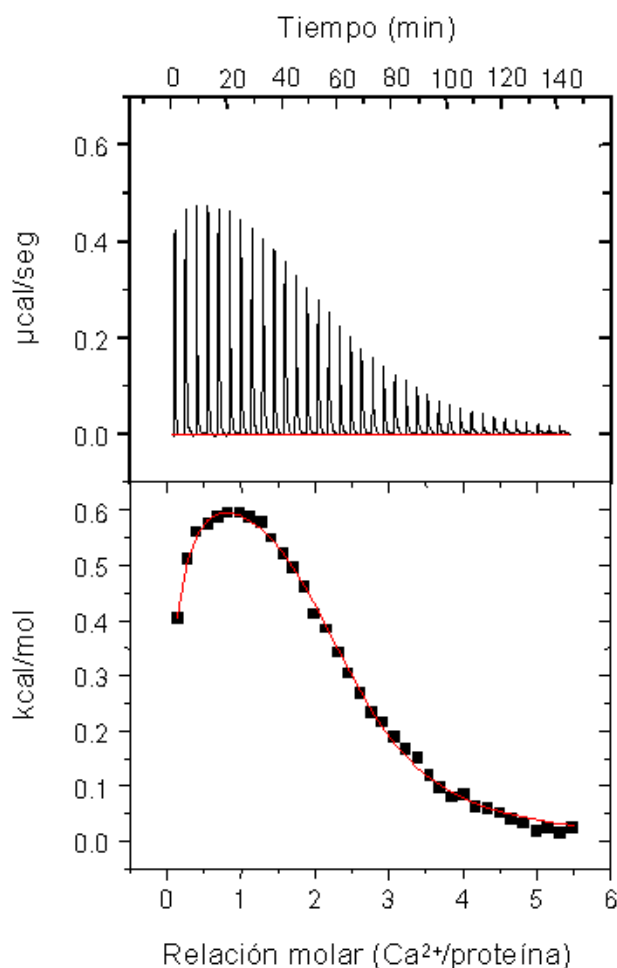


Figura V.1. Valoración calorimétrica del dominio C2 de la PKC α con Ca $^{2+}$ a 25°C. La celda de la muestra contenía el dominio C2 de la PKC α (250 μ M) preparado en tampón Hepes 25 mM pH 7,4 y NaCl 100 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca $^{2+}$ contaminante. La celda referencia contenía agua destilada y desionizada calidad Milli Q. La disolución de CaCl $_2$ 5 mM estándar se cargó en una jeringa de 250 μ l y se añadió a la celda de la muestra en 22 inyecciones de 8 μ l cada una, en intervalos de 4 min, con una velocidad de inyección de 1 μ l/seg y una agitación de 250 rpm. El calor absorbido o liberado después de cada inyección se muestra en el panel superior. Se llevó a cabo un experimento en idénticas condiciones pero en ausencia de proteína para calcular el calor de dilución del ligando (datos no mostrados). Los datos obtenidos tras sustraer la contribución de la dilución del ligando, normalizados por mol de ligando inyectado se muestran en el panel inferior. La línea dibujada sobre los puntos experimentales muestra el mejor ajuste obtenido utilizando el *modelo de dos tipos de sitios* del programa Origin 5.0 (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Los parámetros termodinámicos del proceso de unión de Ca $^{2+}$ al dominio C2 de la PKC α se muestran en la Tabla V.1 y provienen de al menos tres experimentos independientes.

Por otro lado, no se puede descartar que este valor tan bajo se deba al modelo utilizado para el análisis de los datos experimentales (*modelo de dos tipos de sitios*

de unión del programa Origin 5.0, Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Este modelo asume que los dos tipos de sitios de unión son independientes. A pesar de que existen distintas pruebas que apoyan la idea de que la unión de Ca^{2+} al dominio C2 de las PKCs clásicas es cooperativa (Kohout y col., 2002 y Capítulo IV de esta Memoria), el análisis de la curva de unión obtenida utilizando el *modelo de dos tipos de sitios* independientes fue el que mejor ajuste produjo de los datos experimentales, lo cual podría deberse parcialmente a la saturación inicial del sitio de alta afinidad de Ca^{2+} .

Otros modelos utilizados para llevar a cabo el ajuste de los datos, como el *modelo de unión secuencial* a distintos sitios de Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) que sí contempla la posibilidad de que exista el fenómeno de la cooperatividad pero fija el número de cada sitio a uno, dieron lugar a peores ajustes que los mostrados con el *modelo de dos tipos de sitios* independientes.

Tabla V.1. Parámetros termodinámicos de la unión de Ca^{2+} a los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ a 25°C obtenidos mediante el *modelo de dos tipos de sitios* independientes del programa Origin 5.0 (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Estos resultados muestran los valores de la media y la desviación estándar procedentes de, al menos, tres experimentos independientes.

Proteína	Número de sitios de unión (n)	K_d (μM)	ΔH° kcal/mol	ΔS° cal/mol-K	ΔG° kcal/mol
Dominio C2 de la PKC α	$n_1 = 0,2 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,3$	$-2,3 \pm 0,3$	17,8	-7,6
	$n_2 = 2,4 \pm 0,2$	$22,2 \pm 2,6$	$0,74 \pm 0,04$	23,8	-6,3
Dominio C2 de la PKC β II	$n_1 = 0,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	$-3,8 \pm 0,3$	14,3	-8,0
	$n_2 = 1,8 \pm 0,1$	$17,2 \pm 3,3$	$0,77 \pm 0,08$	24,4	-6,5
Dominio C2 de la PKC γ	$n_1 = 0,2 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,2$	$-3,6 \pm 0,9$	15,8	-8,3
	$n_2 = 2,1 \pm 0,1$	$4,3 \pm 1,3$	$0,29 \pm 0,03$	25,6	-7,3

La unión de Ca^{2+} al dominio C2 de la PKC β II (Figura V.2) produjo unos resultados similares. De nuevo se encontraron dos tipos de sitios, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. Mientras el primero presentó una constante de disociación $K_d = 1,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$, el segundo obtuvo una constante de disociación $K_d = 17,2 \pm 3,3 \mu\text{M}$ (Tabla V.1), resultados muy similares a los obtenidos para el dominio C2 de la

PKC α . Además, también el primer sitio une Ca $^{2+}$ de forma exotérmica ($\Delta H = -3,8 \pm 0,3$ kcal/mol), mientras el segundo lo hace de manera endotérmica ($\Delta H = 0,77 \pm 0,08$ kcal/mol) (Tabla V.1).

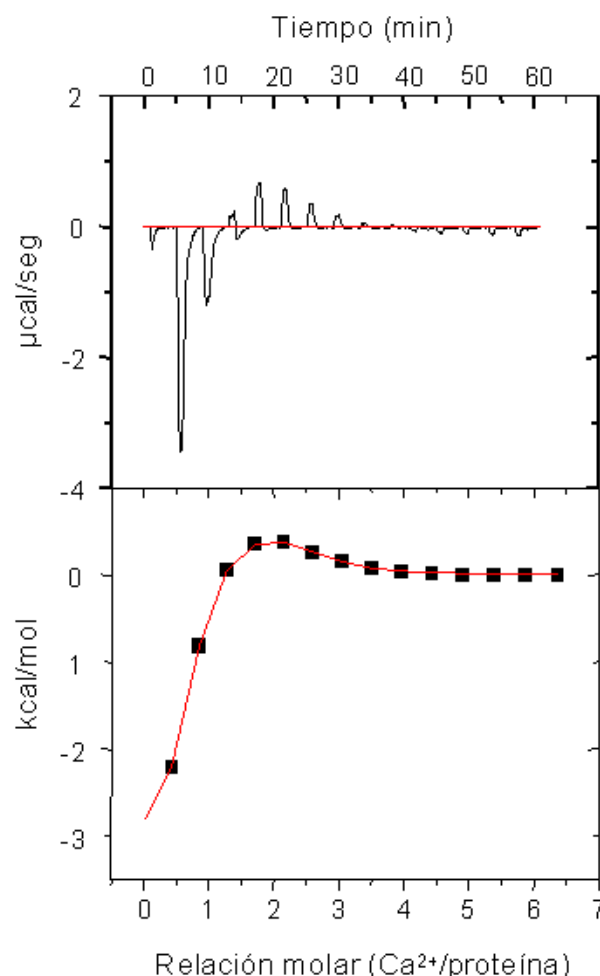


Figura V.2. Valoración calorimétrica del dominio C2 de la PKC β II con Ca $^{2+}$ a 25°C. La celda de la muestra contenía el dominio C2 de la PKC β II (250 μ M) preparado en tampón MOPS 20 mM pH 6,8 y NaCl 100 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca $^{2+}$ contaminante. La celda referencia contenía agua destilada y desionizada calidad Milli Q. La disolución de CaCl $_2$ 5 mM estándar se cargó en una jeringa de 250 μ l y se añadió a la celda de la muestra en 15 inyecciones de 1 μ l la primera y 20 μ l las restantes, realizadas en intervalos de 4 min, con una velocidad de inyección de 1 μ l/seg y una agitación de 250 rpm. El calor absorbido o liberado después de cada inyección se muestra en el panel superior. Se llevó a cabo un experimento en idénticas condiciones pero en ausencia de proteína para calcular el calor de dilución del ligando (datos no mostrados). Los datos obtenidos tras sustraer la contribución de la dilución del ligando, normalizados por mol de ligando inyectado se muestran en el panel inferior. La línea dibujada sobre los puntos experimentales muestra el mejor ajuste obtenido utilizando el *modelo de dos tipos de sitios* del programa Origin 5.0 (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Los parámetros termodinámicos del proceso de unión de Ca $^{2+}$ al dominio C2 de la PKC β II se muestran en la Tabla V.1 y provienen de al menos tres experimentos independientes.

Al igual que el dominio C2 de la PKC α , los resultados obtenidos sugieren que el sitio de alta afinidad uniría una molécula de Ca²⁺ ($n_1 = 0,6 \pm 0,1$), mientras que el de baja afinidad uniría dos ($n_2 = 1,8 \pm 0,1$) (Tabla V.1). La obtención de unos mejores valores en la estequiometría de la unión de Ca²⁺ podría deberse a que este dominio C2 presentó la menor cooperatividad en la unión de Ca²⁺ según los datos de fluorescencia en equilibrio comentados en el Capítulo IV de esta misma Memoria y, por lo tanto, supondría una situación más adecuada para el ajuste con el *modelo de dos tipos de sitios* independientes del programa Origin 5.0.

Finalmente, el ajuste de los datos experimentales de la unión de Ca²⁺ al dominio C2 de la PKC γ (Figura V.3) resultó similar a los dos anteriores, aunque más parecido al del dominio C2 de la PKC α . Nuevamente, se encontraron dos tipos de sitios, uno de alta afinidad (con una constante de disociación $K_d = 0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$) que une una molécula de Ca²⁺ ($n_1 = 0,2 \pm 0,1$) de forma exotérmica ($\Delta H = -3,6 \pm 0,9$ kcal/mol) y otro de baja afinidad (con una constante $K_d = 4,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$) que une dos moléculas de Ca²⁺ ($n_2 = 2,1 \pm 0,1$) de manera endotérmica ($\Delta H = 0,29 \pm 0,03$ kcal/mol) (Tabla V.1).

En todos los casos, la unión de Ca²⁺ al sitio de alta afinidad está estabilizada por los cambios de entropía como de entalpía, mientras que en la unión de Ca²⁺ al sitio de baja afinidad está dirigida entrópicamente (Tabla V.1).

3.1.2. Valoración del enlace a fosfolípidos.

Para valorar la unión de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ a fosfolípidos se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC y POPS (relación molar 2:3). Dado que los dominios C2 se unen a fosfolípidos aniónicos, la concentración total de fosfolípido utilizado se normalizó usando el porcentaje de fosfatidilserina presente en las mezclas (60 %) y teniendo en cuenta que sólo la monocapa externa de las vesículas utilizadas (aproximadamente 60% del lípido total) puede establecer interacciones con la proteína. Se analizó la unión de fosfolípidos a los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ tanto en ausencia como en presencia de una concentración saturante de Ca²⁺ (1 mM). A esta concentración de Ca²⁺, la relación molar

([Ca²⁺]/proteína) es 5:1 y en estas condiciones, según los experimentos de titulación de Ca²⁺ anteriormente detallados, los tres dominios se encuentran prácticamente saturados con este ión.

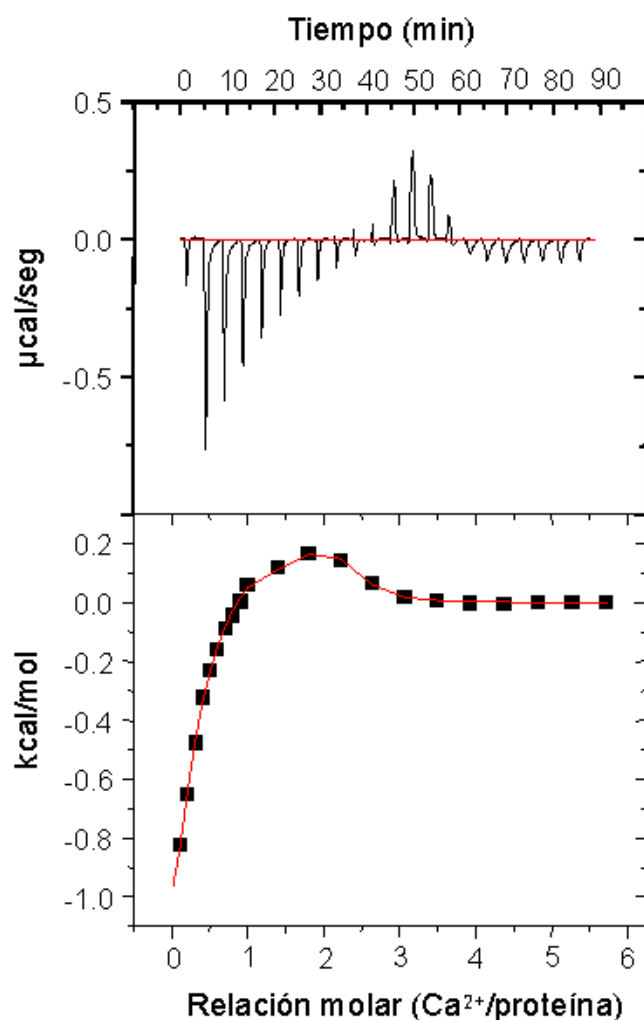


Figura V.3. Valoración calorimétrica del dominio C2 de la PKC γ con Ca²⁺ a 25°C. La celda de la muestra contenía el dominio C2 de la PKC γ (250 μ M) preparado en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,0 y NaCl 100 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca²⁺ contaminante. La celda referencia contenía agua destilada y desionizada calidad Milli Q. La disolución de CaCl₂ 5 mM estándar se cargó en una jeringa de 250 μ l y se añadió a la celda de la muestra en 22 inyecciones de 1 μ l la primera, 5 μ l las diez siguientes y 20 μ l las restantes, realizadas en intervalos de 4 min, con una velocidad de inyección de 1 μ l/seg y una agitación de 250 rpm. El calor absorbido o liberado después de cada inyección se muestra en el panel superior. Se llevó a cabo un experimento en idénticas condiciones pero en ausencia de proteína para calcular el calor de dilución del ligando (datos no mostrados). Los datos obtenidos tras sustraer la contribución de la dilución del ligando, normalizados por mol de ligando inyectado se muestran en el panel inferior. La línea dibujada sobre los puntos experimentales muestra el mejor ajuste obtenido utilizando el *modelo de dos tipos de sitios* del programa Origin 5.0 (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Los parámetros termodinámicos del proceso de unión de Ca²⁺ al dominio C2 de la PKC γ se muestran en la Tabla VI.1 y provienen de al menos tres experimentos independientes.

Dado que se conoce tanto la zona del dominio C2 de la PKC α que interacciona con el fosfolípido en presencia de Ca²⁺ como la forma en que lo hace (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002), los resultados experimentales de la unión de fosfolípidos a los tres dominios C2 utilizados se ajustaron al *modelo de un tipo de sitios de unión* (Origin 5.0, Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Otros modelos teóricos del citado programa no mejoraron los resultados comentados a continuación.

En ausencia de Ca²⁺ (Figura V.4A), se observó para los tres dominios una débil interacción con las mezclas fosfolipídicas, caracterizada por una constante de disociación $K_d = 430 \pm 41 \mu\text{M}$. En estos casos, no fue posible alcanzar la saturación, lo cual indica que se trataba principalmente de un proceso de unión inespecífico. Los resultados en presencia de una concentración saturante de Ca²⁺ fueron claramente diferentes, pero similares para los tres dominios (Figura V.4B). En estas condiciones se observó una unión de tipo exotérmico con unas variaciones en la entalpía $\Delta H = -1,33 \pm 0,01 \text{ kcal/mol}$ para el dominio C2 de la PKC α , $\Delta H = -0,5 \pm 0,01 \text{ kcal/mol}$ para el dominio C2 de la PKC β II y $\Delta H = -1,30 \pm 0,02 \text{ kcal/mol}$ para el dominio C2 de la PKC γ (Tabla VI.2). La fosfatidilserina se unió a los tres dominios con afinidades similares, de forma que las constantes de disociación K_d fueron $18,0 \pm 1,2 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la PKC α , $9,7 \pm 1,5 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la PKC β II y $18,4 \pm 2,3 \mu\text{M}$ para el dominio C2 de la PKC γ (Tabla VI.2).

Tabla V.2. Parámetros termodinámicos de la unión de SUV compuestas por POPC/POPS (relación molar 2:3) a los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ en presencia de Ca²⁺ saturante a 25°C, obtenidos mediante el *modelo de un tipo de sitios de unión* (Origin 5.0, Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Estos resultados muestran los valores de la media y la desviación estándar procedentes de tres experimentos independientes.

Proteína	Número de sitios de unión (n)	K_d (μM)	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (cal/mol·K)	ΔG° (kcal/mol)
Dominio C2-PKC α	$4,5 \pm 0,1$	$18,0 \pm 1,2$	$-1,33 \pm 0,01$	17,3	-6,5
Dominio C2-PKC β II	$5,6 \pm 0,1$	$9,7 \pm 1,5$	$-0,50 \pm 0,01$	21,3	-6,8
Dominio C2-PKC γ	$4,9 \pm 0,1$	$18,4 \pm 2,3$	$-1,30 \pm 0,02$	17,3	-6,4

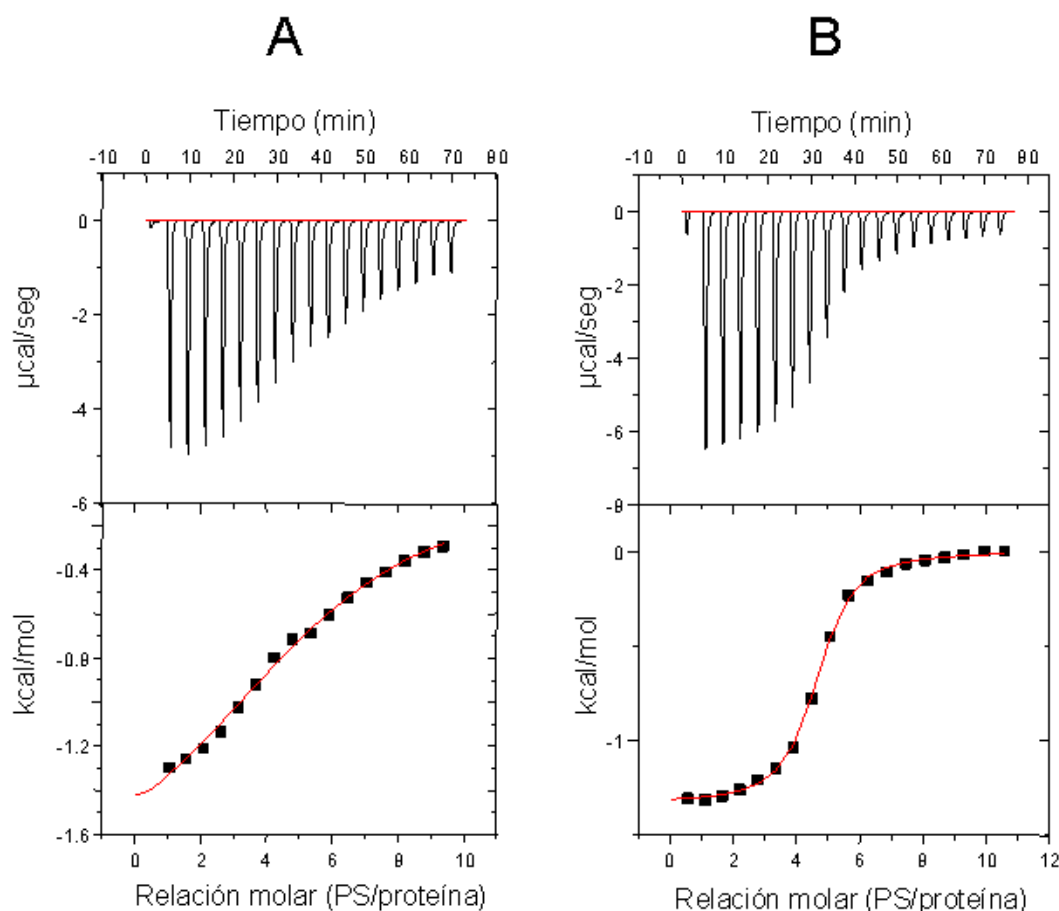


Figura V.4. Valoración calorimétrica del dominio C2 de la PKC α con SUV a 25°C. La titulación se llevó a cabo utilizando una disolución de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/POPS (relación molar 2:3). Las vesículas se prepararon en el mismo tampón que el de la proteína. Se muestra la valoración de la unión de SUV al dominio C2 de la PKC α en ausencia de Ca $^{2+}$ (A) y en presencia de una concentración de Ca $^{2+}$ saturante (1 mM Ca $^{2+}$) (B). La celda de la muestra contenía el dominio C2 de la PKC α (200 μ M) preparado en tampón Hepes 25 mM pH 7,4 y NaCl 100 mM junto con CaCl $_2$ 1 mM. La celda referencia contenía agua destilada y desionizada calidad Milli Q. La disolución con SUV de POPC/POPS (30 mM), relación molar 2:3, se cargó en una jeringa de 250 μ l y se añadió a la celda de la muestra en 19 inyecciones de 1 μ l la primera y 15 μ l las restantes, realizadas en intervalos de 4 min, con una velocidad de inyección de 1 μ l/seg y una agitación de 250 rpm. El calor absorbido o liberado después de cada inyección se muestra en el panel superior. Se llevó a cabo un experimento en idénticas condiciones pero en ausencia de proteína para calcular el calor de dilución las vesículas (datos no mostrados). Los datos obtenidos tras sustraer el calor de dilución del ligando y normalizar por mol de ligando inyectado se muestran en el panel inferior. La línea dibujada sobre los puntos experimentales muestra el mejor ajuste obtenido utilizando el *modelo de un tipo de sitios de unión* del programa Origin 5.0 (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Se realizaron experimentos idénticos con los dominios C2 de la PKC β II y de la PKC γ , utilizando sus tampones correspondientes, y se obtuvieron resultados similares (datos no mostrados). Los parámetros termodinámicos del proceso de unión de SUV al dominio C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ en presencia de Ca $^{2+}$ saturante se muestran en la Tabla V.2 y provienen de tres experimentos independientes cada uno.

A pesar de que el número de moléculas de fosfolípido que se enlazan a la proteína es difícil de establecer debido a la naturaleza del ligando (recordemos que son vesículas unilamelares pequeñas), los resultados obtenidos del ajuste fueron muy similares para los tres dominios, ya que el valor de la estequiometría (n) fue de $4,5 \pm 0,1$ moléculas de POPS para el dominio C2 de la PKC α , $5,6 \pm 0,1$ moléculas de POPS para el dominio C2 de la PKC β II y $4,9 \pm 0,1$ moléculas de POPS para el dominio C2 de la PKC γ (Tabla V.2). En todos los casos, el proceso de unión de los dominios C2 a la mezcla de fosfolípidos resultó estabilizado por la contribuciones de la entalpía y la entropía, a pesar de que este último factor fue el más importante (Tabla V.2).

3.2. Análisis mediante DSC.

Para poder profundizar en el conocimiento de las posibles diferencias estructurales y de afinidad de estos tres dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC, se comparó su comportamiento durante la desnaturalización térmica utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) y se analizó, a su vez, el efecto de la presencia de distintos ligandos, como el Ca²⁺ y los fosfolípidos aniónicos, sobre dicho proceso de desnaturalización.

Los termogramas se recogieron utilizando un calorímetro de barrido de alta sensibilidad modelo MicroCal MC-2 (MicroCal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) y se analizaron utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.).

3.2.1. Efecto del Ca²⁺ sobre la desnaturalización térmica de los dominios C2.

La desnaturalización del dominio C2 de la PKC α se vio afectada de forma importante por la concentración de Ca²⁺ (Figura V.5). Así, mientras en ausencia de Ca²⁺ (0,2 mM EGTA) la transición comenzó aproximadamente a 40,2°C, con una temperatura de desnaturalización T_m de 49,8°C, la adición progresiva de Ca²⁺ produjo un desplazamiento gradual del pico de la transición hacia temperaturas mayores. De

esta forma, a la mayor concentración de Ca²⁺ ensayada (165,61 mM), que se correspondía con una relación molar ([Ca²⁺]/proteína) 1000:1, la temperatura de inicio de la transición fue de 74,2°C, mientras que la T_m aumentó hasta 80,3°C. Esto significa que la estructura de la proteína se encuentra fuertemente estabilizada tras la unión de Ca²⁺, lo cual se puede deducir de estudios espectroscópicos realizados anteriormente (García-García y col., 1999 y el Capítulo VI de esta Memoria).

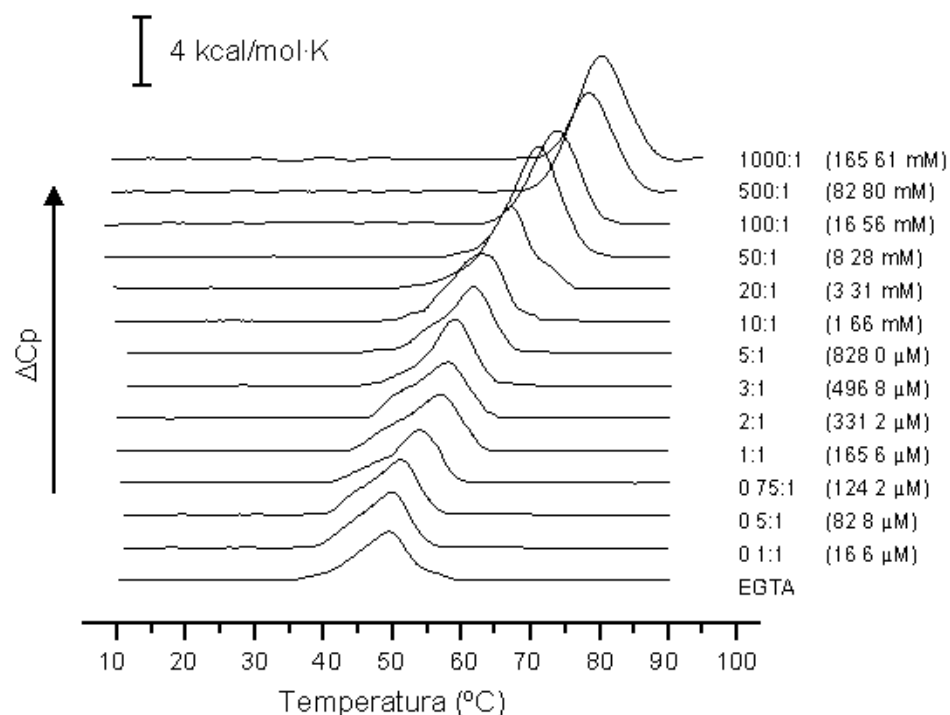


Figura V.5. Denaturalización térmica del dominio C2 de la PKC α en presencia de diferentes concentraciones de Ca²⁺. El dominio C2 de la PKC α (3 mg/ml, 165,61 μM) se sometió a un barrido de temperaturas desde 10°C a 90°C aproximadamente, con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. La proteína se preparó en tampón Hepes 25 mM pH 7,4, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína, se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca²⁺ contaminante. La celda de referencia del microcalorímetro contenía el tampón de la proteína. La concentración de Ca²⁺ no ligado a EGTA se calculó teniendo en cuenta el equilibrio con la concentración de EGTA empleada y se muestra como relación molar ([Ca²⁺]/proteína) y, entre paréntesis, como concentración molar, a la derecha de cada termograma. Tras sustraer la línea de base correspondiente al barrido realizado con tampón en la celda de la muestra y en la de referencia, se construyó la línea de base en la región de la transición y se analizaron los termogramas utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) para obtener los valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ y ΔH .

Además, cabe destacar el hecho de que a concentraciones de Ca²⁺ bajas, hasta 3,31 mM, es decir una relación molar ([Ca²⁺]/proteína) 20:1, la anchura de los picos de transición de los termogramas fue mayor que en ausencia de ligando o a mayores concentraciones del mismo. Esto parece reflejar la existencia de varias componentes

que podrían relacionarse con la presencia de una población heterogénea de proteína, con diferentes grados de saturación por Ca^{2+} , es decir, con formas que han unido diferentes cantidades de ligando (uno, dos o hasta tres iones Ca^{2+}), según los resultados de ITC. La adición de mayores concentraciones de Ca^{2+} dio lugar a la obtención de picos de transición más estrechos, monofásicos, correspondientes posiblemente con un estado de la proteína con todos los sitios de unión a Ca^{2+} completamente saturados, y a su vez a un aumento no saturante de la temperatura de transición T_m de forma gradual, sin llegar a una situación de estabilización. Este efecto no saturable del incremento en la T_m es frecuente en los procesos de unión a ligando de numerosas proteínas (Bryant y col., 1974; Fukada y col., 1983; Edge y col., 1985; Brandts y col., 1989), observándose en procesos de equilibrio cuando la concentración de ligando es superior a su constante de unión, incluso después de que todos los sitios de unión estén saturados. En estos casos, el aumento en la temperatura de transición T_m con el incremento de la concentración de ligando no se debe a cambios adicionales en la estructura de la proteína inducidos por el mismo (Fukada y col., 1983), sino que deriva del hecho de que la forma completamente desnaturada de la proteína no puede enlazar ligando y supone un efecto de dilución de la entropía del sistema debido a la desnaturación del ligando tras la desnaturación de la proteína (Brandts y col., 1989). En otras palabras, la adición de elevadas concentraciones de ligando desplaza los equilibrios de desnaturación y de unión hacia la forma nativa de la proteína, por lo que sería preciso aumentar la energía, en este caso, la temperatura, para provocar la desnaturación y así se observaría el aumento en la T_m .

El estudio del dominio C2 de la $\text{PKC}\beta\text{II}$ (Figura V.6) mostró un comportamiento cualitativamente similar al anterior, con un desplazamiento de la transición de la desnaturación térmica hacia temperaturas mayores conforme la concentración de Ca^{2+} aumentó. Así, en ausencia de Ca^{2+} (0,2 mM EGTA), la temperatura de inicio de la transición alcanzó 41,8°C y la temperatura de transición T_m fue 46,8°C, valores similares a los obtenidos en el caso del dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$. En cambio, a la mayor concentración de Ca^{2+} utilizada (164,02 mM), la cual supuso una relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) 1000:1, la temperatura de inicio de la transición fue 74,4°C y la temperatura de transición T_m llegó hasta 78,8°C, valor que es ligeramente inferior al obtenido en el caso anterior.

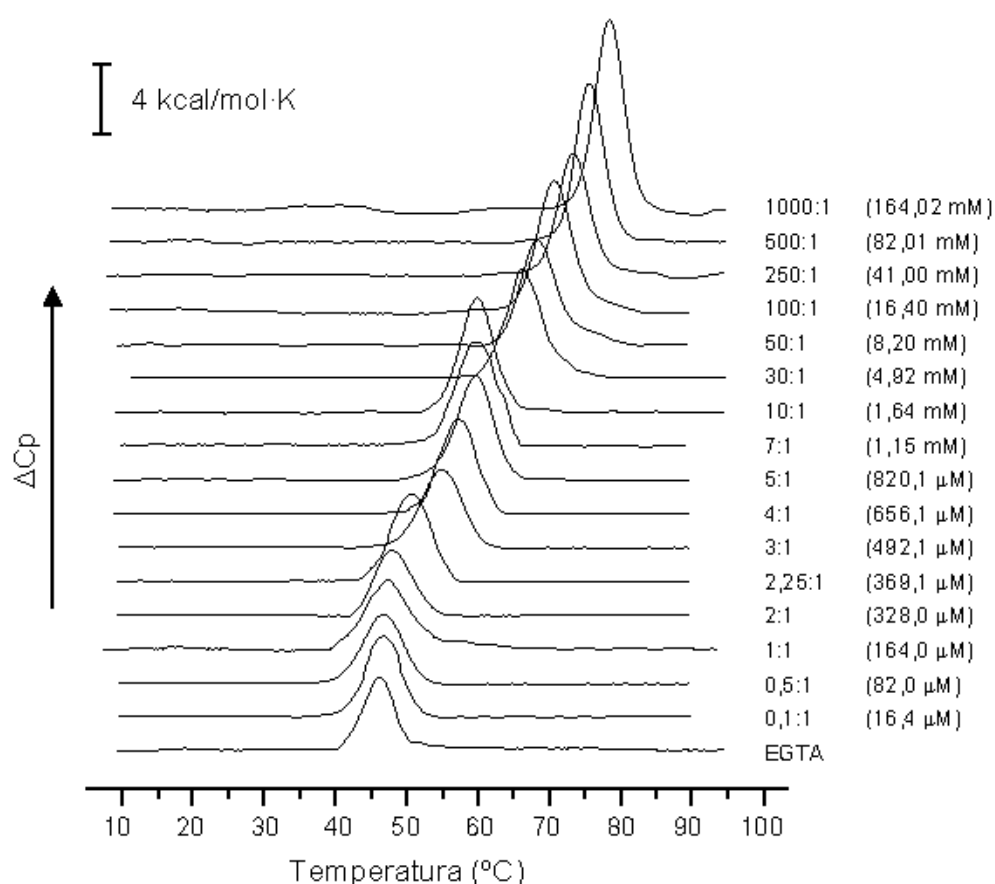


Figura V.6. Desnaturalización térmica del dominio C2 de la PKC β II en presencia de diferentes concentraciones de Ca $^{2+}$. El dominio C2 de la PKC β II (3 mg/ml, 164,01 μ M) se sometió a un barrido de temperaturas desde 10°C a 95°C aproximadamente, con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. La proteína se preparó en tampón MOPS 20 mM pH 6,8, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína, se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca $^{2+}$ contaminante. La celda de referencia del microcalorímetro contenía el tampón de la proteína. La concentración de Ca $^{2+}$ no ligado a EGTA se calculó teniendo en cuenta el equilibrio con la concentración de EGTA empleada y se muestra como relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) y, entre paréntesis, como concentración molar, a la derecha de cada termograma. Tras sustraer la línea de base correspondiente al barrido realizado con tampón en la celda de la muestra y en la de referencia, se construyó la línea de base en la región de la transición y se analizaron los termogramas utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) para obtener los valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ y ΔH .

De nuevo, la anchura de los picos de transición a concentraciones de Ca $^{2+}$ bajas, hasta 1,64 mM, es decir una relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) 10:1, fue mayor con respecto a la observada en ausencia de ligando o a mayores concentraciones del mismo. La mayor anchura inicial de los picos podría reflejar la presencia de moléculas de proteína con diferentes grados de unión a ligando. Con la adición de mayores concentraciones de Ca $^{2+}$ se obtuvieron picos de transición más estrechos,

que se corresponderían con una situación en la que prácticamente todos los sitios de unión a Ca^{2+} en la proteína estarían saturados. También se observa que la temperatura de transición T_m aumentó con la adición de concentraciones crecientes de Ca^{2+} sin llegar a una situación de estabilización, como ocurrió en el caso anterior. No obstante, este incremento en T_m fue más abrupto en este caso, no tan gradual como antes, observándose como dos incrementos más importantes, el primero situado entre unas concentraciones de Ca^{2+} de 328,0 μM y 492,1 μM (que suponen unas relaciones molares ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) de 2:1 y 3:1, respectivamente) y el segundo localizado entre 1,64 mM y 4,92 mM Ca^{2+} (relaciones molares 10:1 y 30:1, respectivamente). Este diferente comportamiento refleja un distinto significado del Ca^{2+} unido en comparación con el dominio C2 de la PKC α , dada la similar afinidad por Ca^{2+} obtenida mediante ITC.

Igualmente, el dominio C2 de la PKC γ también mostró un desplazamiento gradual de la transición térmica hacia temperaturas mayores conforme aumentó la concentración de Ca^{2+} (Figura V.7). En ausencia de Ca^{2+} (0,2 mM EGTA), la temperatura de inicio de la transición apareció a 42,4°C, con una temperatura de transición T_m 47,8°C. Al igual que en los anteriores casos, en presencia de la mayor concentración de Ca^{2+} utilizada (163,08 mM), la cual se corresponde con una relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) 1000:1, la temperatura de inicio de la transición ascendió hasta 79,6°C y la temperatura de transición T_m se situó en 85,4°C, lo cual supone los mayores valores de los tres dominios C2 utilizados. De esta forma, el efecto protector del Ca^{2+} frente a la desnaturalización térmica es mayor en el dominio C2 de la PKC γ que en los otros dos.

Como en los casos anteriores se observó que la anchura de los picos de transición fue mayor a concentraciones de Ca^{2+} bajas, hasta 1,63 mM, es decir, una relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) 10:1, debido posiblemente a la presencia de moléculas de proteína con diferentes grados de unión a ligando. La adición de mayores concentraciones de Ca^{2+} produjo el estrechamiento de los picos de transición, reflejando probablemente una situación en la que prácticamente toda la proteína estaría unida a Ca^{2+} . También se observa que la temperatura de transición T_m aumentó con la adición de concentraciones crecientes de Ca^{2+} sin llegar a una situación de estabilización, como ocurrió en los casos anteriores. De nuevo, a

diferencia del dominio C2 de la PKC α , se observó un incremento en T_m más abrupto, con dos grandes aumentos. El primero se localizó entre las concentraciones de Ca $^{2+}$ 163,1 μ M y 203,8 μ M, que significaron unas relaciones molares ([Ca $^{2+}$]/proteína) de 1:1 y 1,25:1, respectivamente, mientras que el segundo apareció entre 1,63 mM y 4,89 mM (relaciones molares 10:1 y 30:1, respectivamente). Este distinto comportamiento puede reflejar de nuevo el diferente significado del Ca $^{2+}$ unido respecto a las otras isoenzimas y podría estar relacionado con la mayor afinidad general por Ca $^{2+}$ para este dominio observada mediante ITC.

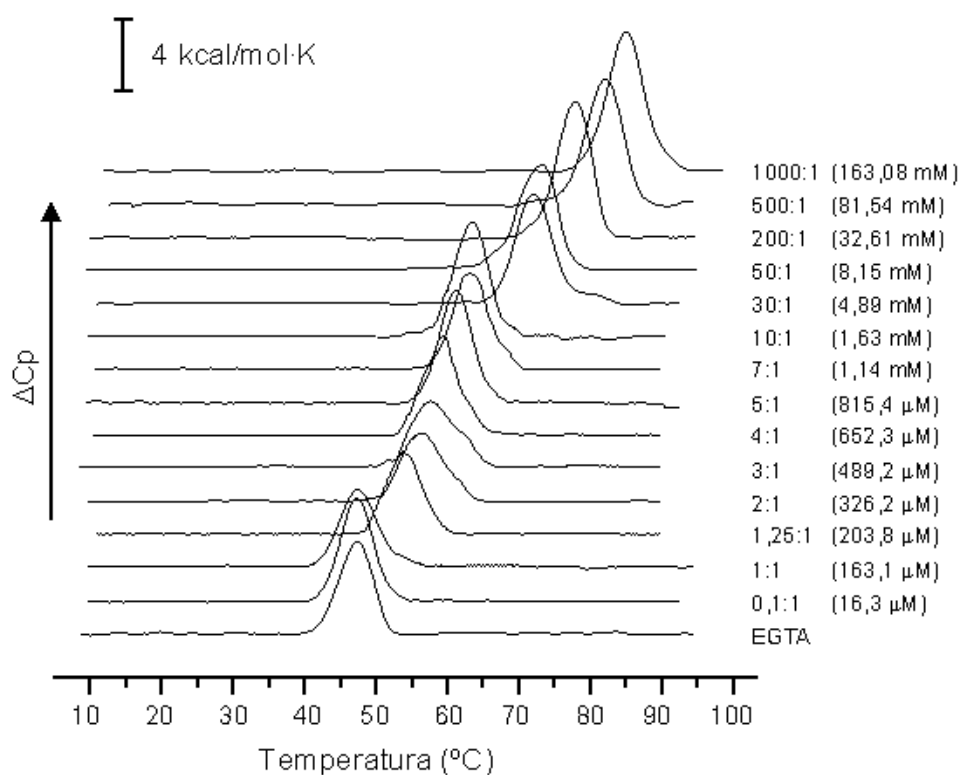


Figura V.7. Desnaturalización térmica del dominio C2 de la PKC γ en presencia de diferentes concentraciones de Ca $^{2+}$. El dominio C2 de la PKC γ (3 mg/ml, 163,08 μ M) se sometió a un barrido de temperaturas desde 10°C a 95°C aproximadamente, con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. La proteína se preparó en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína, se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca $^{2+}$ contaminante. La celda de referencia del microcalorímetro contenía el tampón de la proteína. La concentración de Ca $^{2+}$ no ligado a EGTA se calculó teniendo en cuenta el equilibrio con la concentración de EGTA empleada y se muestra como relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) y, entre paréntesis, como concentración molar, a la derecha de cada termograma. Tras sustraer la línea de base correspondiente al barrido realizado con tampón en la celda de la muestra y en la de referencia, se construyó la línea de base en la región de la transición y se analizaron los termogramas utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) para obtener los valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ y ΔH .

3.2.2. Efecto de la presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos sobre la desnaturalización térmica de los dominios C2.

La adición de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC y POPS, a una relación molar 2:3, modificó notablemente los picos de las transiciones de los tres dominios C2. En todos los casos se utilizó una concentración de SUV 8 mM, equivalente a una relación molar (lípidos/proteína) de 50:1. En general, a una concentración de Ca^{2+} dada, la presencia de fosfolípido provocó un desplazamiento de la temperatura de transición T_m mayor que el observado a la misma concentración de Ca^{2+} pero en ausencia de vesículas. Este efecto pone de manifiesto la acción aditiva de ambos ligandos (Ca^{2+} y fosfolípidos aniónicos) a la hora de estabilizar la estructura de los dominios C2 de las PKCs clásicas.

En ausencia de Ca^{2+} (0,2 mM EGTA), la adición de estas mezclas lipídicas provocó un importante ensanchamiento del pico de transición del dominio C2 de la PKC α (Figura V.8), así como un ligero desplazamiento hacia temperaturas menores, con una temperatura de inicio de la transición de 34,9°C y una temperatura de transición T_m de 48,5°C. Este pico de transición fue bastante ancho, con una anchura a media altura de 20,5°C frente a una anchura a media altura de 5,8°C en ausencia de Ca^{2+} y fosfolípidos. Esto indica posiblemente la presencia de una población de proteína heterogénea, con diferente contenido de lípido unido en el intervalo de la transición. Por otro lado, el descenso en la temperatura de transición (de 49,8°C a 48,5°C) podría deberse a una ligera desestabilización de la proteína en ausencia de Ca^{2+} , o bien podría reflejar una mayor afinidad del lípido por la forma desnaturalizada de la proteína.

La adición de concentraciones crecientes de Ca^{2+} produjo la reducción progresiva del ensanchamiento del pico de la transición hasta alcanzar una anchura similar a la obtenida en ausencia de fosfolípido (Figura V.5), a una concentración de Ca^{2+} 1,66 mM, es decir una relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) 10:1 (la anchura a media altura del pico de transición a esta concentración de Ca^{2+} fue 6,7°C frente a una anchura de 7,6°C en ausencia de fosfolípido a la misma concentración de ligando). Esta reducción de la anchura del pico de transición supondría que toda la proteína estaría unida a los ligandos (Ca^{2+} y fosfolípidos) y podría reflejar el aumento de la afinidad del dominio C2 por el lípido mediado por Ca^{2+} , tal y como se observó de la

titulación directa de ITC anteriormente comentada, indicando así el efecto cooperativo importante en la unión al dominio C2 existente entre ambos ligandos. La temperatura de inicio de la transición a la mayor concentración de Ca^{2+} analizada (165,61 mM), que se corresponde con una relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) 1000:1, fue 74,8°C, mientras que la temperatura de transición T_m fue 80,7°C, valores similares a los obtenidos en ausencia de fosfolípido (Figura V.5). No obstante, más interesante quizás sean los efectos observados con concentraciones de Ca^{2+} no tan elevadas, hasta 1,66 mM o una relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) 10:1, donde las diferencias entre las temperaturas de transición en ausencia ($T_m = 63,1^\circ\text{C}$) y en presencia de fosfolípido ($T_m = 75,5^\circ\text{C}$) sí fueron importantes.

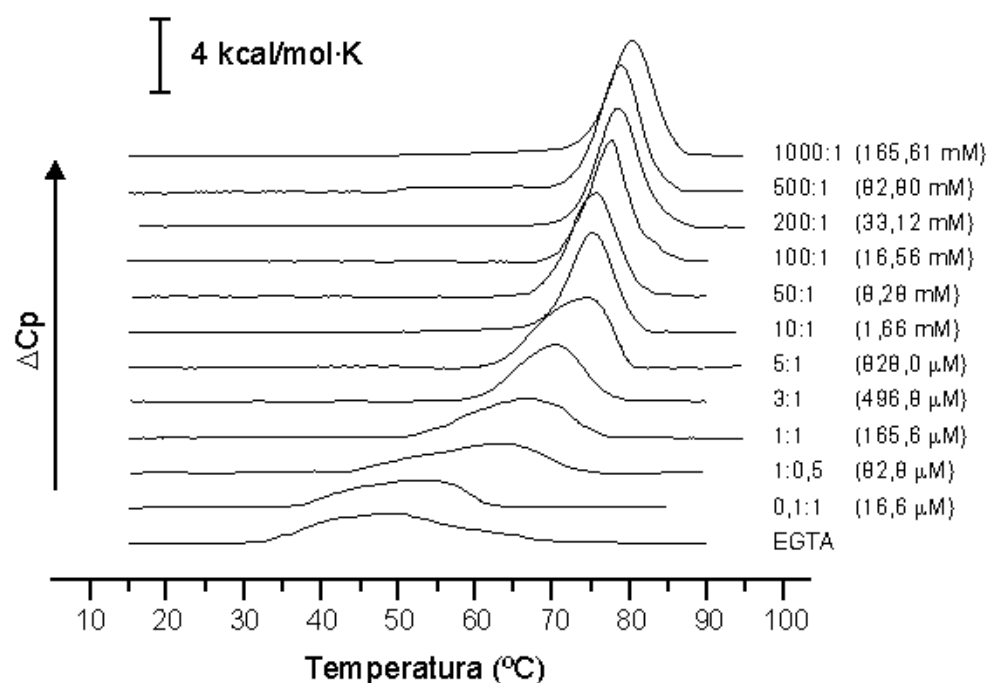


Figura V.8. Desnaturalización térmica del dominio C2 de la PKC α en presencia de SUV con diferentes concentraciones de Ca^{2+} . El dominio C2 de la PKC α (3 mg/ml, 165,61 μM) se sometió a un barrido de temperaturas desde 10°C a 95°C aproximadamente, con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. La proteína se preparó en tampón Hepes 25 mM pH 7,4, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM. Las vesículas unilamelares pequeñas contenían POPC/POPS a una relación molar 2:3 y se prepararon en el mismo tampón que la proteína a una concentración de 8 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína, se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca^{2+} contaminante. La celda de referencia del microcalorímetro contenía el tampón de la proteína. La concentración de Ca^{2+} no ligado a EGTA se calculó teniendo en cuenta el equilibrio con la concentración de EGTA empleada y se muestra como relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) y, entre paréntesis, como concentración molar, a la derecha de cada termograma. Tras sustraer la línea de base correspondiente al barrido realizado con tampón en la celda de la muestra y en la de referencia, se construyó la línea de base en la región de la transición y se analizaron los termogramas utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) para obtener los valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ y ΔH .

Al igual que en el caso anterior, se analizó el comportamiento del dominio C2 de la PKC β II en función de la concentración de Ca $^{2+}$, en presencia de fosfolípidos aniónicos. La adición de SUV con POPC/POPS (relación molar 2:3) al dominio C2 de la PKC β II en ausencia de Ca $^{2+}$ (0,2 mM EGTA) (Figura V.9), produjo también un ensanchamiento del pico de transición, aunque no fue tan importante como en el caso del dominio C2 de la PKC α , así como su desplazamiento hacia temperaturas menores (desde 46,7°C a 43,5°C). La anchura a media altura de este pico de transición fue de 8,9°C, mientras que en ausencia de Ca $^{2+}$ y fosfolípidos tan sólo supuso 5,1°C. Esta ancha transición en ausencia de Ca $^{2+}$ está caracterizada por una temperatura de inicio de 36,8°C y una temperatura de transición T_m de 43,5°C y podría indicar posiblemente la presencia de una población de proteína heterogénea, con diferente contenido de lípido unido en el intervalo de la transición. No obstante, también podría reflejar una ligera desestabilización de la proteína en ausencia de Ca $^{2+}$, o bien que la forma desnaturalizada de la proteína podría mostrar una mayor afinidad por el lípido.

De nuevo, la presencia de concentraciones mayores de Ca $^{2+}$ provocó la reducción de la anchura de los picos de transición hasta alcanzar tamaños similares a los obtenidos en ausencia de fosfolípido (Figura V.6), a una concentración de Ca $^{2+}$ 16,4 mM (relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) 100:1), de forma que la anchura a media altura del pico de la transición fue 4,5°C, mientras que la anchura del pico de la transición en ausencia de fosfolípido a esa misma concentración de ligando fue 5,2°C. Esta reducción de la anchura del pico de transición supondría que a esta concentración de Ca $^{2+}$ toda la proteína estaría unida a los ligandos (Ca $^{2+}$ y fosfolípidos), reflejando así el aumento de la afinidad del dominio C2 por el lípido mediado por la presencia de Ca $^{2+}$, tal y como se observó mediante ITC, e indicando el efecto cooperativo existente entre ambos ligandos en cuanto a la unión al dominio C2. No obstante, cabe destacar que la obtención de estos picos de transición estrechos, similares a los recogidos en ausencia de fosfolípido, ocurrió a una concentración de Ca $^{2+}$ superior en el caso del dominio C2 de la PKC β II (por encima de 1,64 mM o relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) 10:1), respecto al dominio C2 de la PKC α , lo cual reflejaría un distinto comportamiento del Ca $^{2+}$ unido a los dos dominios.

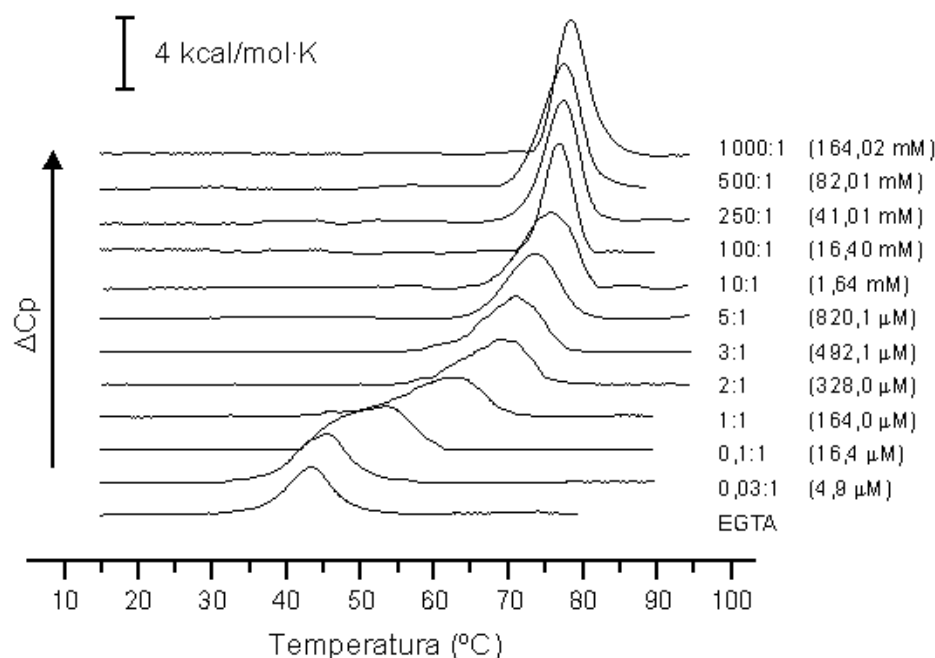


Figura V.9. Desnaturalización térmica del dominio C2 de la PKC β II en presencia de SUV con diferentes concentraciones de Ca $^{2+}$. El dominio C2 de la PKC β II (3 mg/ml, 164,02 μ M) se sometió a un barrido de temperaturas desde 10°C a 95°C aproximadamente, con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. La proteína se preparó en tampón MOPS 20 mM pH 6,8, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM. Las vesículas unilamelares pequeñas contenían POPC/POPS a una relación molar 2:3 y se prepararon en el mismo tampón que la proteína a una concentración de 8 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína, se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca $^{2+}$ contaminante. La celda de referencia del microcalorímetro contenía el tampón de la proteína. La celda de referencia del microcalorímetro contenía el tampón de la proteína. La concentración de Ca $^{2+}$ no ligado a EGTA se calculó teniendo en cuenta el equilibrio con la concentración de EGTA empleada y se muestra como relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) y, entre paréntesis, como concentración molar, a la derecha de cada termograma. Tras sustraer la línea de base correspondiente al barrido realizado con tampón en la celda de la muestra y en la de referencia, se construyó la línea de base en la región de la transición y se analizaron los termogramas utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) para obtener los valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ y ΔH .

A la mayor concentración de Ca $^{2+}$ utilizada (164,02 mM), que supone una relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) 1000:1, la temperatura de inicio de la transición fue 74,8°C, mientras que la temperatura de transición T_m llegó hasta 79,1°C, valores de nuevo muy similares a los que se obtuvieron en ausencia de fosfolípido (Figura V.6). Al igual que en el caso anterior quizás sean más interesantes los efectos observados a menores concentraciones de Ca $^{2+}$, quizás hasta 1,64 mM o una relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) 10:1, donde las diferencias en las transiciones entre las muestras con ($T_m = 75,9^\circ\text{C}$) y sin fosfolípido ($T_m = 60,4^\circ\text{C}$) fueron mucho mayores.

Finalmente, se analizó el comportamiento del dominio C2 de la PKC γ en función de la concentración de Ca $^{2+}$, en presencia de fosfolípidos aniónicos. En el caso del dominio C2 de la PKC γ , la adición de SUV con POPC/POPS (relación molar 2:3) (Figura V.10) en ausencia de Ca $^{2+}$ también dio lugar a un ensanchamiento del pico de transición, junto con un ligero desplazamiento del mismo hacia temperaturas menores (desde 47,8°C hasta 46,7°C). Esta transición mostró una temperatura de inicio de 41,5°C y una temperatura de transición T_m de 46,7°C. La anchura a media altura del pico de la transición en ausencia de Ca $^{2+}$ y fosfolípido era 5,0°C, mientras que en presencia de SUV fue 7,9°C. No obstante, cabe destacar el hecho de que el ensanchamiento en este pico de transición no fue tan acusado como ocurrió para el dominio C2 de la PKC α , probablemente debido a que esta proteína presenta una mayor afinidad por lípido y la mayor parte de la misma estaría unida a los ligandos en este caso. De hecho, la anchura de los picos de transición se reduce hasta los valores de las transiciones en ausencia de fosfolípido (Figura V.7) a partir de la concentración de Ca $^{2+}$ de 326,2 μ M, o bien una relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) de 2:1, donde la anchura fue 7,1°C frente a 6,6°C en ausencia de fosfolípido a la misma concentración de Ca $^{2+}$. Esta reducción de la anchura de los picos de transición reflejaría una situación en la que toda la proteína estaría unida ya a los ligandos (Ca $^{2+}$ y fosfolípidos). De nuevo se observa un comportamiento diferencial del Ca $^{2+}$ unido respecto a los otros dos dominios C2, ya que la unión completa de la proteína a los ligandos ocurre a unas concentraciones de Ca $^{2+}$ inferiores a los anteriores casos.

La mayor concentración de Ca $^{2+}$ utilizada en este caso fue 40,77 mM, que supuso una relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) 250:1, la cual dio lugar a una temperatura de inicio de la transición de 81,1°C y una temperatura de transición T_m de 87,8°C, en este caso valores muy superiores a los obtenidos a una concentración similar de Ca $^{2+}$ pero en ausencia de fosfolípido (Figura V.7). Este dato pone de manifiesto que el efecto protector aditivo del Ca $^{2+}$ y los fosfolípidos aniónicos es mayor para el dominio C2 de la PKC γ que para los otros dos dominios. No obstante, al igual que en los casos anteriores, las concentraciones de Ca $^{2+}$ más interesantes serían hasta 815,4 μ M o una relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) de 2:1, donde las diferencias entre las transiciones con fosfolípido ($T_m = 85,2^\circ\text{C}$) y sin el mismo ($T_m = 63,8^\circ\text{C}$) serían mucho mayores.

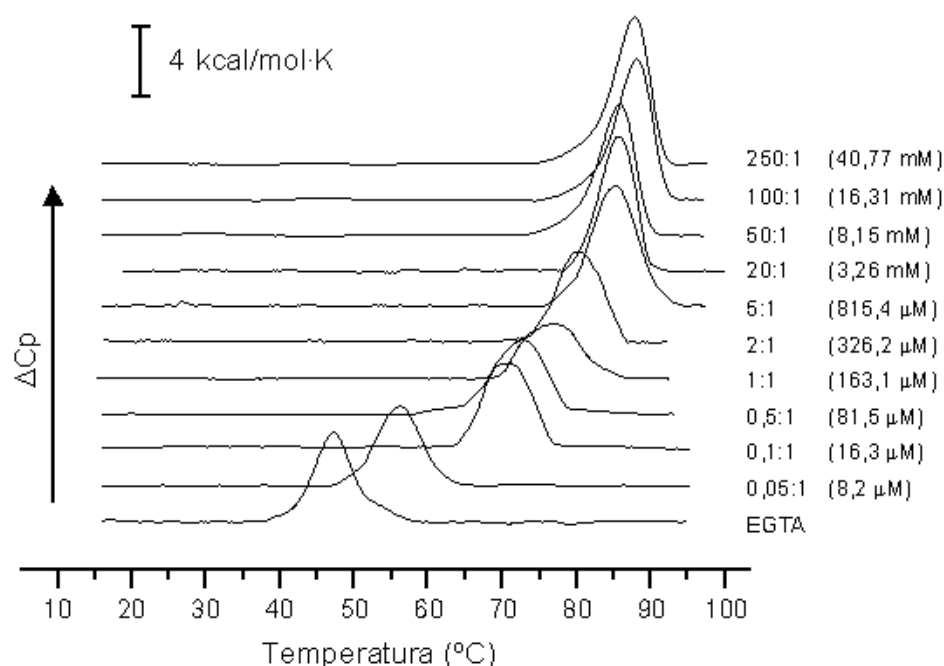


Figura V.10. Desnaturalización térmica del dominio C2 de la PKC γ en presencia de SUV con diferentes concentraciones de Ca $^{2+}$. El dominio C2 de la PKC γ (3 mg/ml, 150 μ M) se sometió a un barrido de temperaturas desde 10°C a 95°C aproximadamente, con una velocidad de calentamiento de 1°C/min. La proteína se preparó en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM. Las vesículas unilamelares pequeñas contenían POPC/POPS a una relación molar 2:3 y se prepararon en el mismo tampón que la proteína a una concentración de 8 mM. Todos los tampones utilizados, así como la propia proteína, se pasaron por columnas con Chelex-100 para eliminar el Ca $^{2+}$ contaminante. La celda referencia del microcalorímetro contenía el tampón de la proteína. La celda de referencia del microcalorímetro contenía el tampón de la proteína. La concentración de Ca $^{2+}$ no ligado a EGTA se calculó teniendo en cuenta el equilibrio con la concentración de EGTA empleada y se muestra como relación molar ([Ca $^{2+}$]/proteína) y, entre paréntesis, como concentración molar, a la derecha de cada termograma. Tras sustraer la línea de base correspondiente al barrido realizado con tampón en la celda de la muestra y en la de referencia, se construyó la línea de base en la región de la transición y se analizaron los termogramas utilizando el programa Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) para obtener los valores de T_m , $\Delta T_{1/2}$ y ΔH .

3.2.3. Análisis del efecto del Ca $^{2+}$ y fosfolípidos sobre la desnaturalización térmica de los dominios C2.

3.2.3.1. Dependencia de T_m con la concentración de Ca $^{2+}$.

Para estudiar el efecto de la presencia de Ca $^{2+}$ con mayor detalle se representó la variación en la temperatura de transición (ΔT_m) frente a la concentración de Ca $^{2+}$ en escala logarítmica (Figura V.11). La variación en la temperatura de transición (ΔT_m) se calculó como la diferencia entre la T_m a cada concentración de Ca $^{2+}$ utilizada y la T_m en ausencia de Ca $^{2+}$.

a) En ausencia de fosfolípidos.

En ausencia de fosfolípidos, la representación de ΔT_m frente a la concentración de Ca^{2+} en escala logarítmica para los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC (Figura V.11A) mostró una dependencia no saturante con la concentración de ligando, tal y como cabe esperar de un sistema en el que la forma desnaturalizada de la proteína no es capaz de reconocer y unir ligando (Brandts y col., 1989), de forma que la adición de mayores concentraciones de ligando provoca el desplazamiento del equilibrio hacia la forma nativa de la proteína, de manera que es preciso aplicar una mayor energía para provocar la desnaturalización. El incremento total de ΔT_m fue similar para los dominios C2 de la PKC α y de la PKC β II (30,6°C y 32,1°C, respectivamente), pero superior para el dominio C2 de la PKC γ (37,6°C), lo cual quizás podría indicar una mayor afinidad de este dominio por Ca^{2+} a las temperaturas comprendidas dentro del intervalo en el que tiene lugar la transición. No obstante, quizás sea más interesante el hecho de que el incremento de T_m comenzó a concentraciones de Ca^{2+} superiores en el caso del dominio C2 de la PKC β II, lo cual pone de manifiesto el diferente significado del Ca^{2+} unido a los tres dominios, partiendo de unas afinidades similares como se desprende del análisis de ITC previo.

b) En presencia de fosfolípidos.

La adición de concentraciones crecientes de Ca^{2+} en presencia de vesículas fosfolípídicas compuestas por POPC/POPS (relación molar 2:3) dio lugar a un aumento en la temperatura de transición T_m con la concentración de Ca^{2+} , de igual forma que en el caso anterior (Figura V.11B), a pesar de que en este caso el carácter no saturante no estuvo tan marcado. El aumento de la T_m fue mayor en presencia de fosfolípidos a una misma concentración de Ca^{2+} , lo cual podría suponer un claro aumento de la afinidad por Ca^{2+} en el proceso de unión y consecuente estabilización, debido al efecto cooperativo de la presencia de fosfolípido.

De nuevo, el aumento total en la temperatura de transición T_m de los tres dominios C2 en presencia de vesículas y en función del incremento de la concentración de Ca^{2+} , alcanzó unos valores mayores para el dominio C2 de la PKC γ (41,1°C), mientras que el de la PKC α el incremento fue el menor (32,2°C). El dominio C2 de la PKC β II mostró un incremento total en la T_m en presencia de

fosfolípidos intermedio (35,5°C). No obstante, estos incrementos fueron del mismo orden que los obtenidos en ausencia de vesículas (30,6°C para el dominio C2 de la PKC α , 32,1°C para el dominio C2 de la PKC β II y 37,6°C para el dominio C2 de la PKC γ), lo cual indicaría que en esas condiciones se han alcanzado situaciones de estabilización similares. Cabe destacar que el incremento en T_m en presencia de fosfolípidos ocurre de manera diferente para las tres proteínas (por ejemplo, comienza a menores concentraciones de Ca^{2+} en el caso del dominio C2 de la PKC γ), poniendo así de manifiesto el diferente significado de los ligandos unidos.

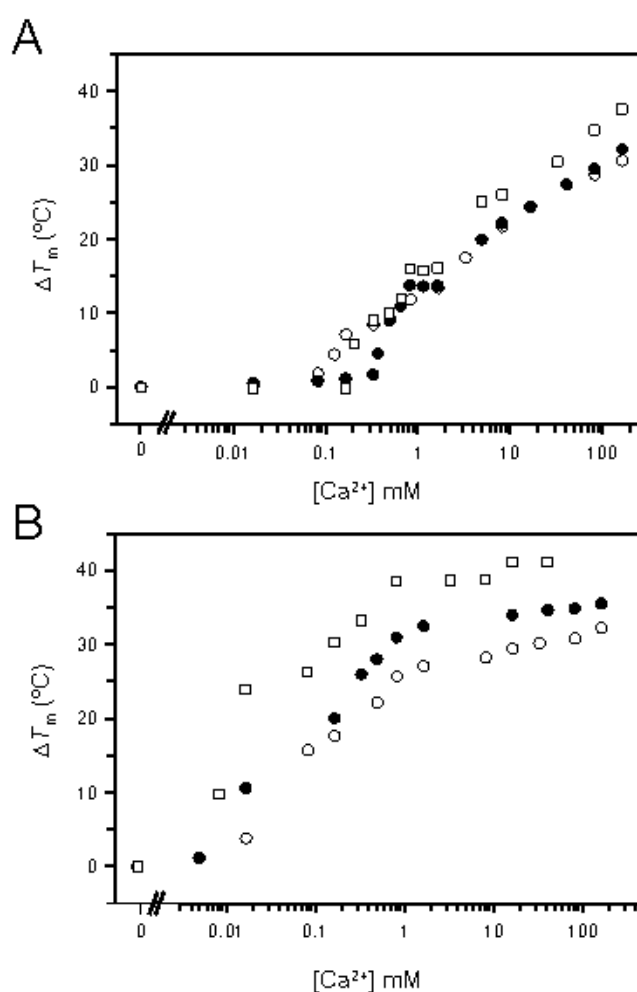


Figura V.11. Dependencia de la temperatura de desnaturalización de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC respecto de la concentración de Ca^{2+} . Se muestra la variación de la temperatura media de transición a cada concentración de Ca^{2+} respecto de la ausencia de dicho ión para los dominios C2 de la PKC α (o), de la PKC β II (•) y de la PKC γ (□), en ausencia (A) y en presencia (B) de fosfolípido. Se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas compuestas por POPC/POPS (relación molar 2:3). La temperatura de transición (T_m) obtenida en ausencia de Ca^{2+} se utilizó para realizar la sustracción de las distintas T_m calculadas para cada concentración de Ca^{2+} y calcular así la variación en la temperatura de transición (ΔT_m). Este valor se representó frente a la concentración molar de Ca^{2+} .

3.2.3.2. Representaciones de van't Hoff.

La forma integrada de la ecuación de van't Hoff para una proteína monomérica que une “ n ” moléculas de ligando, como es nuestro caso, vendría definida por la expresión dada por Fukada y col. (1983):

$$\frac{\Delta H_{vH}}{RT_m} + n \ln L = \text{constante}$$

donde ΔH_{vH} es la variación de la entalpía de van't Hoff, R es una constante, T_m es la temperatura de transición, n es el número de moléculas de ligando que se unen y L es la concentración de ligando.

De esta manera se puede representar esta ecuación integrada de van't Hoff relacionando la concentración de ligando libre en escala logarítmica, en este caso $\ln([Ca^{2+}])$, en función de la inversa de la temperatura de transición, $1/T_m$. Para elaborar estas representaciones, la concentración de Ca^{2+} libre a esa temperatura ($[Ca^{2+}]_{libre}$) se estimó de la siguiente forma

$$[Ca^{2+}]_{libre} = \frac{1}{2} [Ca^{2+}]_{total} \quad \text{si } [Ca^{2+}]_{total} \leq [sitios]_{total}$$

$$[Ca^{2+}]_{libre} = [Ca^{2+}]_{total} - \frac{1}{2} [sitios]_{total} \quad \text{si } [Ca^{2+}]_{total} \geq [sitios]_{total}$$

donde $[Ca^{2+}]_{total}$ es la concentración de Ca^{2+} total disponible y $[sitios]_{total}$ es la concentración total de sitios de unión, que se obtiene a partir de la concentración de proteína (Brandts y Lin, 1990).

La dependencia lineal entre el logaritmo de la concentración de ligando y el inverso de la T_m refleja el aumento en la temperatura de transición T_m de forma no saturable conforme aumenta la concentración de ligando (Fukada y col., 1983; Brandts y col., 1989; Sánchez-Ruiz, 1992). Este efecto es característico de la desnaturalización reversible de proteínas en presencia de ligando (Brandts y Lin., 1990) o bien de procesos irreversibles cuando la disociación del ligando ocurre en una etapa previa a la etapa limitante de la velocidad del proceso (Sánchez-Ruiz, 1992), como debe ser nuestro caso, dado que las transiciones fueron de carácter

irreversible. El análisis y asignación del modelo concreto que representaría nuestro sistema requiere estudios adicionales.

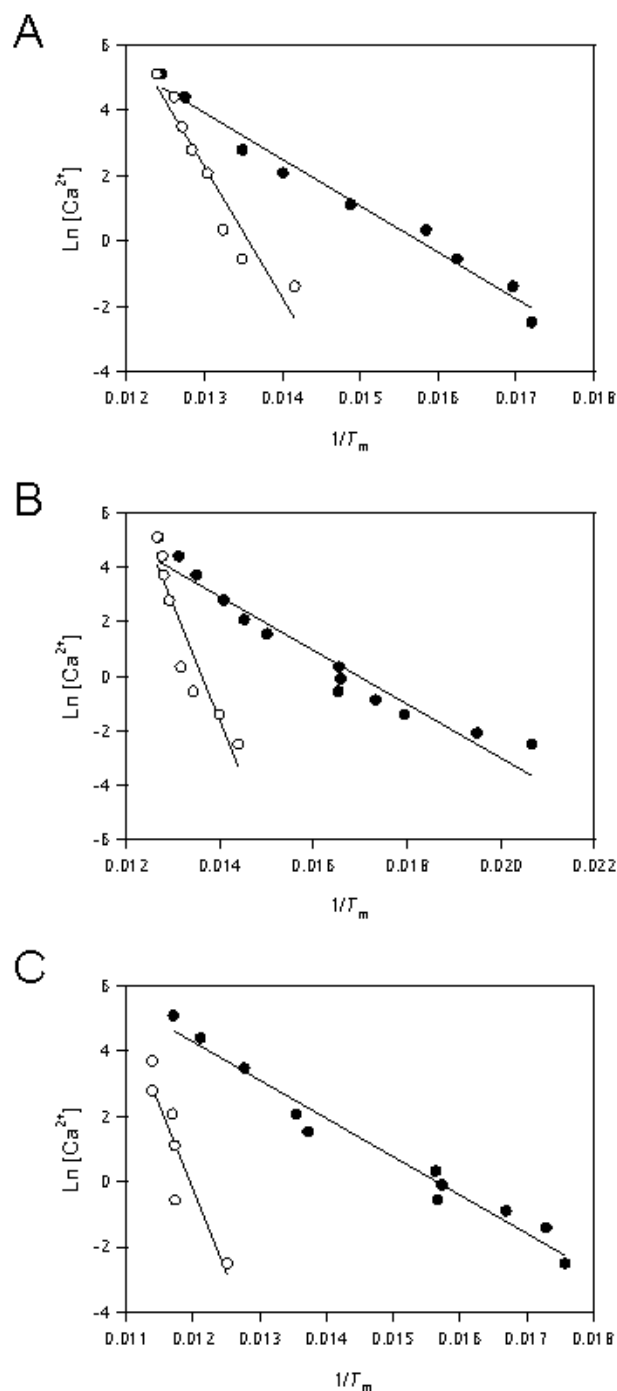


Figura V.12. Representaciones de van't Hoff de la unión de Ca^{2+} a los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC. Se muestran las representaciones de van't Hoff de la unión de Ca^{2+} a los dominios C2 de la PKC α (A), de la PKC β II (B) y la PKC γ (C), en ausencia (●) y en presencia de fosfolípido (○). Se observa la dependencia lineal entre la concentración molar de ligando libre en escala logarítmica y el inverso de la T_m .

En el caso de la unión de Ca^{2+} a los tres dominios C2 de las PKCs clásicas, tanto en ausencia como en presencia de fosfolípidos (Figura V.12), las representaciones de van't Hoff mostraron, en general, una dependencia lineal de la concentración de ligando libre en escala logarítmica con el inverso de la T_m . Así, queda reflejado el carácter no saturante del aumento de la T_m conforme aumenta la concentración de ligando, como era de esperar suponiendo que la disociación del ligando ocurre en una etapa previa a la limitante de la velocidad del proceso (Sánchez-Ruiz, 1992), como se propuso anteriormente. No obstante, en el caso del dominio C2 de la PKC β II, parece observarse cierta curvatura en esta representación. La explicación más sencilla a este efecto, que no se observa con los otros dominios, podría estar relacionada con la unión de ligando a sitios inespecíficos a altas concentraciones de ligando.

3.2.3.3. Dependencia de la variación de ΔH_d con la variación de T_m

La representación del incremento en la variación de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, frente a la variación en la temperatura de transición, ΔT_m , puede proporcionar una información importante acerca del proceso de interacción entre la proteína y el ligando. El incremento en la variación de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, se calculó como la diferencia entre la variación de la entalpía de desnaturalización a una concentración de ligando determinada, y la variación de la entalpía de desnaturalización en ausencia de ligando. Por otro lado, el incremento de la temperatura de transición, ΔT_m , se calculó como la diferencia entre la temperatura de transición a una concentración de ligando determinada y la temperatura de transición en ausencia de ligando, como se comentó anteriormente.

El incremento en la variación entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, de una proteína en presencia de un ligando a concentraciones bajas del mismo es proporcional a la fracción de sitios saturados, dando lugar a un aumento rápido en el valor ΔH_d que refleja la disociación del ligando unido tras la desnaturalización de la proteína, si su entalpía de unión es significativa. En cambio, una vez alcanzada la saturación de los sitios de unión, las curvas crecen de forma gradual reflejando únicamente el aumento de ΔH_d asociado al incremento positivo de la capacidad

calorífica, ΔC_p , para la desnaturalización de proteínas (Brandts y Lin., 1990), según la siguiente ecuación:

$$\Delta(\Delta H_d) = \Delta H_0 + \Delta C_p(\Delta T_m) - \Delta H_L \left(\frac{K_L [L]}{1 + K_L [L]} \right)$$

donde ΔH_0 es el valor del cambio de la entalpía en ausencia de ligando; ΔH_L es la fracción de proteína ligada a una temperatura inmediatamente anterior al inicio de la transición, que sería igual a 1 cuando se alcanza la saturación; K_L es la constante de equilibrio de la unión de ligando.

En la Figura V.13 se muestra el incremento de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC frente al aumento de la temperatura de transición, ΔT_m , con concentraciones crecientes de Ca^{2+} y en ausencia de fosfolípido, observándose una dependencia prácticamente lineal en todo el intervalo de medida para las tres proteínas.

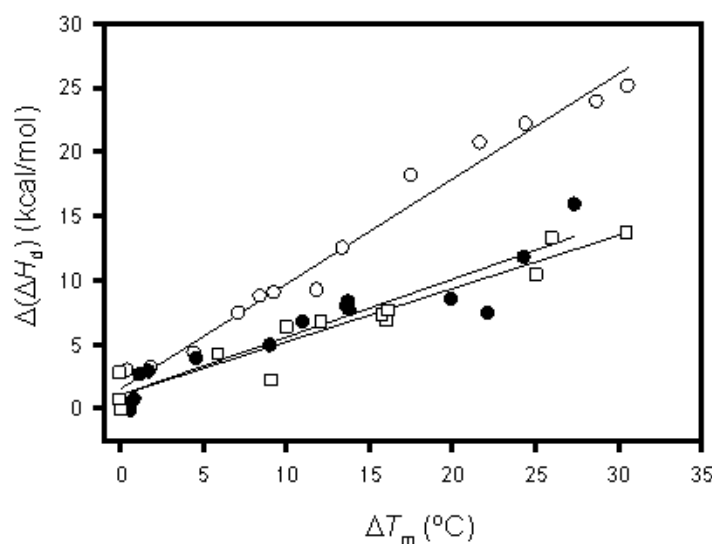


Figura V.13. Representaciones de la dependencia de la variación de la entalpía de desnaturalización de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC con el incremento de la temperatura de transición. Se observan las dependencias aproximadamente lineales de las variaciones de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, con el aumento de la temperatura de transición, ΔT_m , para la unión de Ca^{2+} a los dominios C2 de la PKC α (○), de la PKC β II (●) y la PKC γ (□), en ausencia de fosfolípido.

Esta dependencia lineal sugiere que la variación de la entalpía de desnaturalización, ΔH_d , debida a la disociación del Ca^{2+} unido es muy pequeña y que la representación de $\Delta(\Delta H_d)$ con ΔT_m refleja, fundamentalmente, el aumento de la capacidad calorífica de la desnaturalización, ΔC_p , de los dominios C2 (Brandts y Lin, 1990). De esta manera, a partir de la pendiente de la recta que relaciona $\Delta(\Delta H_d)$ con ΔT_m se podría estimar el valor del aumento de la capacidad calorífica, ΔC_p , según la ecuación anteriormente comentada (Brandts y Lin, 1990). Los valores de ΔC_p así estimados para los tres dominios C2 ($0,8 \pm 0,2$ kcal/mol·K para el dominio C2 de la PKC α , $0,5 \pm 0,1$ kcal/mol·K para el dominio C2 de la PKC β II y $0,4 \pm 0,1$ kcal/mol·K para el dominio C2 de la PKC γ) son del orden de los calculados a partir de los termogramas ($1,09 \pm 0,25$ kcal/mol·K para el dominio C2 de la PKC α , $0,49 \pm 0,10$ kcal/mol·K para el dominio C2 de la PKC β II y $0,59 \pm 0,19$ kcal/mol·K para el dominio C2 de la PKC γ). Este comportamiento es razonable si se tienen en cuenta los datos obtenidos mediante ITC anteriormente comentados, donde los calores de unión del Ca^{2+} a los dominios C2 a 25°C fueron pequeños y la variación de la entalpía neta para la disociación de Ca^{2+} del dominio C2 de la PKC α fue aproximadamente $-0,82 \pm 0,38$ kcal/mol; $-2,26 \pm 0,46$ kcal/mol para el dominio C2 de la PKC β II; $-3,02 \pm 0,96$ kcal/mol para el dominio C2 de la PKC γ (Tabla V. 1).

En presencia de SUV, la representación del incremento de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, frente al aumento de la temperatura de transición, ΔT_m , con concentraciones crecientes de Ca^{2+} mostró dos comportamientos diferentes a distintas concentraciones de ligando. A bajas concentraciones de Ca^{2+} , se observaron pequeños cambios de $\Delta(\Delta H_d)$ frente a ΔT_m , que rápidamente aumentaron linealmente a partir de unas concentraciones de ligando relativamente bajas en el caso de los dominios C2 de la PKC α y de la PKC γ ($82,8 \mu\text{M}$ y $16,3 \mu\text{M}$ o relaciones molares $[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$ de 0,5 y 0,1, respectivamente). En cambio el comportamiento del dominio C2 de la PKC β II fue distinto y, a pesar de que la relación entre $\Delta(\Delta H_d)$ y ΔT_m permaneció constante a bajas concentraciones de Ca^{2+} , la dependencia lineal entre estos parámetros apareció bastante más tarde en relación a los otros dos dominios, a una concentración de Ca^{2+} de $820,1 \mu\text{M}$, que supone una relación molar $[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$ superior a 5 (Figura V.14).

Los valores de ΔC_p estimados a partir de la pendiente de esta representación, según la ecuación comentada anteriormente (Brandts y Lin, 1990), fueron $1,4 \pm 0,1$ kcal/mol.K para el dominio C2 de la PKC α y $0,7 \pm 0,2$ kcal/mol.K para el dominio C2 de la PKC γ . Estos valores estimados para los dominios C2 de la PKC α y de la PKC γ son del mismo orden que los calculados previamente a partir de los termogramas ($0,99 \pm 0,30$ kcal/mol.K y $0,97 \pm 0,10$ kcal/mol.K, respectivamente). De esta forma, de nuevo la relación entre el incremento de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, con el aumento de la temperatura de transición, ΔT_m , refleja, fundamentalmente, el aumento de la capacidad calorífica de la desnaturalización, ΔC_p , de estos dos dominios C2 (Brandts y Lin, 1990).

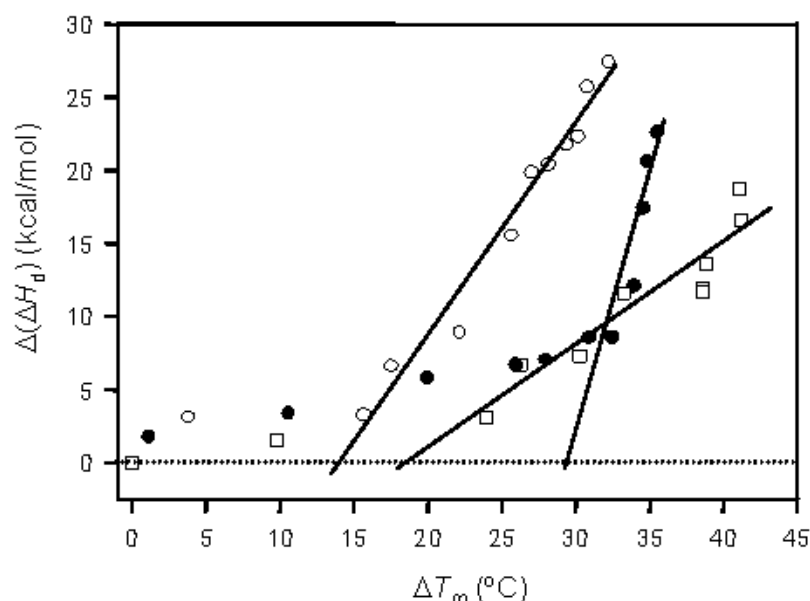


Figura V.14. Representaciones de la dependencia de la variación de la entalpía de desnaturalización de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC con el incremento de la temperatura de transición. Se observan las dependencias aproximadamente lineales de las variaciones de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, con el aumento de la temperatura de transición, ΔT_m , para la unión de Ca^{2+} a los dominios C2 de la PKC α (○), de la PKC β II (●) y la PKC γ (□), en presencia de SUV compuestas por POPC/POPS (relación molar, 2:3).

Para el dominio C2 de la PKC β II, el valor estimado de ΔC_p a partir de la pendiente de la representación del incremento de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, con el aumento de la temperatura de transición, ΔT_m , fue $3,2 \pm 0,4$ kcal/mol.K, mientras que el valor obtenido a partir de los termogramas fue $1,60 \pm$

0,15 kcal/mol·K para el dominio C2 de la PKC β II. Esta discrepancia quizás pueda estar relacionada con el comportamiento diferente observado para el dominio C2 de la PKC β II en la representación de van't Hoff integrada comentado anteriormente. Todo esto podría reflejar una unión inespecífica de ligando.

El hecho de que las aproximaciones lineales no pasen próximas al origen de coordenadas, como sí ocurría en ausencia de fosfolípido (Figura V.13), sino que ahora se encuentren desplazadas hacia valores mayores de incremento de la temperatura de transición, ΔT_m , es indicativo del efecto protector frente a la desnaturalización que aporta la presencia de fosfolípido unido en presencia de Ca $^{2+}$. Así, la extrapolación de la recta estimada hasta el nivel cero del incremento de la variación de la entalpía de desnaturalización, es decir, $\Delta(\Delta H_d) = 0$, condujo a un valor de ΔT_m de aproximadamente 13,8°C para el dominio C2 de la PKC α , lo cual correspondería a un valor de temperatura de transición T_m de 62,3°C, puesto que el valor estimado en presencia de SUV y en ausencia de Ca $^{2+}$ era de 48,5°C. De acuerdo con los resultados de ITC comentados anteriormente, en presencia de Ca $^{2+}$ la afinidad de los fosfolípidos hacia el dominio C2 de la PKC α aumentó considerablemente. Esta diferencia en el modo de unión del lípido en función de la presencia o ausencia de Ca $^{2+}$ podría explicar la diferencia observada entre el valor de la temperatura de transición T_m del dominio C2 de la PKC α con fosfolípidos pero en ausencia de Ca $^{2+}$ (48,5°C), donde el fosfolípido se une de forma débil e inespecífica, y el valor extrapolado (62,3°C) obtenido con la recta estimada en presencia de Ca $^{2+}$, situación en la que el enlace del fosfolípido al dominio C2 se hace más fuerte y específica debido a la presencia del ión.

Se obtuvieron resultados similares con el dominio C2 de la PKC γ (Figura V.14), aunque el aumento de la temperatura de transición fue mayor que en el caso anterior, con un valor de ΔT_m a $\Delta(\Delta H_d) = 0$ de 18,1°C que supondría un valor de T_m 64,8°C. De nuevo, el hecho de que el valor de la temperatura de transición T_m del dominio C2 de la PKC γ en presencia de fosfolípidos pero en ausencia de Ca $^{2+}$ (46,7°C) no coincida con el valor extrapolado de la recta estimada (64,8°C) refleja el efecto de la unión del fosfolípido a la proteína de forma específica debido a la presencia de Ca $^{2+}$.

En el caso del dominio C2 de la PKC β II, la existencia de cierta curvatura en la representación de van't Hoff, así como el desplazamiento de la dependencia lineal entre $\Delta(\Delta H_d)$ y ΔT_m hacia concentraciones mayores de Ca^{2+} , hace que no se pueda descartar la posibilidad de la creación de interacciones inespecíficas a concentraciones de ligando altas, particularmente en presencia de lípido. Esto podría explicar el valor alto de ΔC_p estimado, así como el elevado aumento de la temperatura de transición observado (ΔT_m a $\Delta(\Delta H_d) = 0$ de $29,1^\circ\text{C}$, lo que supondría un valor de $T_m = 72,7^\circ\text{C}$), a partir de la representación de la variación de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, en función del aumento de la temperatura de transición, ΔT_m a estas altas concentraciones de Ca^{2+} (Figura V.14). No obstante, tampoco se puede descartar completamente que las diferencias observadas estén relacionadas con el hecho de que la afinidad del fosfolípido por el dominio C2 de la PKC β II en presencia de Ca^{2+} fuera dos veces mayor que para los otros dos dominios, según los experimentos de ITC comentados anteriormente (Tabla V.2).

4. DISCUSIÓN.

A pesar de la homología de secuencia y de la similitud estructural general de los dominios C2 de las isoenzimas de la PKC α , PKC β II y PKC γ (como ya se comentó en el Capítulo IV de esta Memoria), las afinidades que muestran por Ca^{2+} y fosfolípido, así como su comportamiento frente a la desnaturalización térmica en presencia de dichos ligandos son diferentes. Estas diferencias, que en principio se podrían considerar como sutiles, pueden llegar a ser significativas en condiciones fisiológicas para la regulación selectiva de las diferentes isoenzimas y así poder explicar las distintas especializaciones funcionales de los miembros de cada subfamilia de la PKC. Además, los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de unión de Ca^{2+} a estos dominios C2 son distintos a los publicados anteriormente con otros dominios C2 de distintas proteínas.

La calorimetría diferencial de barrido y la calorimetría de titulación isotérmica son las únicas técnicas disponibles para valorar los cambios en la entalpía

de una proteína en diferentes situaciones. Estas técnicas nos sirven además para caracterizar un proceso de interacción entre biomoléculas.

Los tres dominios presentan unas afinidades por Ca^{2+} relativamente similares. La interacción de estos dominios C2 con Ca^{2+} está caracterizada por la presencia de dos tipos de sitios, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. El primero uniría una molécula de Ca^{2+} de forma exotérmica, mientras que el segundo uniría dos moléculas de Ca^{2+} de manera endotérmica. A pesar de esta semejanza, existen diferencias en cuanto a la termodinámica del proceso de asociación que podrían estar relacionadas con el significado fisiológico de los distintos estados de unión a Ca^{2+} . De forma global, se puede considerar que el dominio C2 de la PKC γ presentó una mayor afinidad por Ca^{2+} . La estequiometría global de unión de Ca^{2+} a estos dominios C2 según nuestros resultados de ITC está de acuerdo con recientes estudios de la estructura de los dominios C2 de la PKC α (Ochoa y col., 2002) y de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998) mediante difracción de rayos-X.

La presencia de Ca^{2+} favorece en gran medida la interacción con fosfolípidos de membranas, poniendo de nuevo de manifiesto el papel intermediario del Ca^{2+} en esta interacción entre el dominio C2 y los fosfolípidos aniónicos (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). En presencia de Ca^{2+} saturante, la afinidad por fosfolípido de los tres dominios es muy parecida, observándose, no obstante, un ligero aumento en la afinidad hacia el dominio C2 de la PKC β II. La comparación de los valores de los cambios en la entalpía (ΔH) y entropía (ΔS) del sistema durante la unión de los fosfolípidos a los tres dominios en presencia de Ca^{2+} saturante, muestra que el aumento de la afinidad hacia el dominio C2 de la PKC β II se debe al componente entrópico y podría reflejar una mayor desolvatación de la superficie de unión al fosfolípido o una menor inmovilización de las regiones implicadas en la unión del mismo a este dominio.

Sin duda alguna, las situaciones más interesantes resultarían de analizar la afinidad por lípido en condiciones de concentraciones de Ca^{2+} sub-saturantes, lo cual sería más cercano a las condiciones fisiológicas y podría poner de manifiesto mayores diferencias entre los distintos dominios. No obstante, estos experimentos no se pudieron llevar a cabo debido a que, en condiciones sub-saturantes de Ca^{2+} , la

adición de fosfolípido promovía la unión de Ca^{2+} libre al dominio C2, de forma que no fue posible discernir entre las contribuciones independientes de cada elemento y no se pudieron obtener resultados claros. De igual manera, tampoco se pudo estudiar la unión de Ca^{2+} al dominio C2 en presencia de fosfolípido, ya que en este caso, conforme se añadía Ca^{2+} , se producía la unión de este ión y de fosfolípido a la proteína y, de nuevo, fue imposible poder distinguir entre las contribuciones debidas a cada ligando, de forma que tampoco se pudieron obtener resultados claros.

Resulta interesante comparar estos resultados con los obtenidos en diferentes estudios con otros dominios C2. Así, el dominio C2 de la fosfolipasa A2c presenta un solo sitio de unión de Ca^{2+} exotérmico (Xu y col., 1998), al igual que el dominio C2 de la fosfolipasa $\text{C}\delta_1$ (Grobler y Hurley, 1998). En cambio, el dominio C2 de la proteína fragmina 60 une Ca^{2+} de forma exotérmica pero con la presencia de dos tipos de sitios (Sklyarova y col., 2002). El dominio C2 de la fosfolipasa $\text{D}\alpha$ une un ión Ca^{2+} exotérmicamente, mientras que el dominio C2 de la fosfolipasa $\text{D}\beta$ enlaza un ión Ca^{2+} de manera endotérmica y dos más exotérmicamente (Zheng y col., 2000). En este último caso (fosfolipasa $\text{D}\beta$), los autores utilizaron el mismo modelo para el ajuste de los datos que el que se usó en nuestro estudio (*modelo de dos tipos de sitios*). De esta manera, el comportamiento de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC en cuanto a la unión de Ca^{2+} es diferente respecto al de otros dominios C2 de distintas proteínas.

El estudio de la interacción de Ca^{2+} y fosfolípidos con los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC mediante DSC resultó bastante complejo. La unión de Ca^{2+} protege a los tres dominios C2 frente a la desnaturalización térmica, como se puede apreciar en el desplazamiento de la temperatura de transición entre el estado nativo y el desnaturalizado hacia temperaturas mayores. Además de observar un aumento de la T_m de carácter no saturable conforme aumentó la concentración de Ca^{2+} , la dependencia lineal entre el logaritmo de la concentración de ligando y el inverso de la T_m (representaciones de van't Hoff integradas), así como el hecho de tratarse de transiciones de tipo irreversible, parecen indicar que nos encontramos ante un sistema caracterizado por un proceso irreversible donde la disociación del ligando ocurre en una fase anterior a la etapa limitante del proceso (Sánchez-Ruiz, 1992). Por otro lado, los cambios en la entalpía de desnaturalización parecen reflejar su

dependencia con la temperatura a través del incremento en la capacidad calorífica (ΔC_p) de la proteína que tiene lugar durante su desnaturalización térmica (Brandts y Lin, 1990), como se desprende de las dependencias lineales entre la variación de la entalpía de desnaturalización, $\Delta(\Delta H_d)$, y el incremento de la temperatura de transición, ΔT_m . La contribución de la disociación del ligando a la entalpía de desnaturalización del complejo proteína/ Ca^{2+} es muy pequeña, como cabría esperar de los resultados obtenidos mediante ITC (Tabla V.1). A pesar de que el efecto protector originado por el Ca^{2+} comenzó a menores concentraciones para el dominio C2 de la PKC α , la protección total fue de mayor magnitud para el dominio C2 de la PKC γ , como cabría esperar de su mayor afinidad por Ca^{2+} . Además, el efecto protector frente a la desnaturalización observado sobre el dominio C2 de la PKC α es más gradual respecto a los observados con las otras proteínas. Parece ser que no sólo es importante el número total de iones Ca^{2+} unidos al dominio C2 para promover su estabilización, sino que esta unión también tiene un significado cualitativo, en el sentido de que a pesar de presentar afinidades similares, la unión de Ca^{2+} promueve diferentes protecciones frente a la desnaturalización térmica en cada dominio. Es decir, se observa diferente protección, en presencia de la misma concentración de Ca^{2+} , o lo que es lo mismo, en el mismo estado de saturación con Ca^{2+} dadas las afinidades similares de esta interacción. Por lo tanto, las diferencias más relevantes no residen en la cantidad de Ca^{2+} unido (una, dos o tres moléculas), sino cómo interacciona con el dominio, lo cual se traduce en un diferente comportamiento en disolución, que supone un sistema más parecido a lo que puede ocurrir en el citoplasma celular *in vivo*.

La presencia adicional de fosfolípidos aniónicos potenció el efecto protector frente a la desnaturalización, lo cual refleja el efecto cooperativo y la estrecha relación existente entre ambos ligandos, apoyando a su vez el papel intermediario o puente del Ca^{2+} en la unión de fosfolípido al dominio (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). De esta manera, a la mismas concentraciones de Ca^{2+} , se observó un mayor desplazamiento de la temperatura de transición de la desnaturalización para los tres dominios en presencia de fosfolípido. En ausencia de Ca^{2+} , los termogramas obtenidos con los tres dominios en presencia de fosfolípido mostraron picos de transición más anchos que en ausencia de ambos ligandos y su temperatura de transición media fue ligeramente menor. Este efecto fue más importante en el caso

del dominio C2 de la PKC α . El ensanchamiento de los picos podría estar relacionado con la interacción del fosfolípido con el dominio C2 a través no del sitio de unión de Ca²⁺, sino de la región rica en Lys donde el Ca²⁺ no participa y reflejaría la existencia de moléculas de proteína con diferentes grados de unión a lípido, de forma que la saturación total no se alcance hasta mayores concentraciones de Ca²⁺. Por otro lado, el descenso en la temperatura de transición puede deberse a una ligera desestabilización de la proteína en ausencia de Ca²⁺, o bien podría mostrar una mayor afinidad del lípido por la forma desnaturalizada de la proteína (Edge y col., 1985; Hu y Sturtevant, 1989). A pesar de que las asociaciones favorables de proteínas con sus ligandos típicamente estabilizan a las proteínas, algunos estudios han mostrado cierta desestabilización mediada por ligandos (Epan y col., 2001). Podría ser que las interacciones del fosfolípido con la región rica en Lys hagan descender la cooperatividad de la transición, probablemente a través del núcleo de sándwich β característico de la estructura tridimensional del dominio C2 o bien que el fosfolípido establezca interacciones con la proteína de tipo detergente en estas condiciones. La adición de Ca²⁺ provocó el estrechamiento de los picos de transición, debido a la formación de estados de saturación homogéneos dentro del intervalo de temperaturas en el que transcurre la transición a esas concentraciones de Ca²⁺. De nuevo, parece que este sistema se corresponde con un proceso irreversible donde la disociación del ligando ocurre en una fase anterior a la etapa limitante del proceso, como se desprende del aumento de la T_m de carácter no saturable observado conforme aumentó la concentración de Ca²⁺, de la dependencia lineal entre el logaritmo de la concentración de ligando y el inverso de la T_m , así como del hecho de tratarse de transiciones de tipo irreversible. Además, de nuevo, los cambios en la entalpía de desnaturalización parecen reflejar su dependencia con la temperatura a través del incremento en la capacidad calorífica (ΔC_p) de la proteína que tiene lugar durante su desnaturalización térmica. Cabe destacar, nuevamente, la importancia cualitativa de la interacción conjunta con estos ligandos, de forma que no sólo sería importante la cantidad unida de los mismos, sino que dicha unión parece traducirse en un diferente significado cualitativo para cada dominio.

Este estudio permitió una visión más profunda que la obtenida en anteriores trabajos espectroscópicos (Kohout y col., 2002 y los resultados del Capítulo IV de esta memoria) en cuanto al proceso de unión de Ca²⁺ a los dominios C2 de las

isoenzimas clásicas de la PKC. Las diferencias con ese trabajo donde se utilizó la espectroscopía de fluorescencia pueden deberse a que mientras ITC supone una medida directa de la unión de ligandos a macromoléculas, la espectroscopía de fluorescencia intrínseca detecta cambios procedentes de la mayor o menor exposición de los residuos de Trp de la proteína fruto de la interacción con ligandos, de forma que supone una medida más indirecta del proceso de unión.

De esta manera, a pesar de que parece ser que los tres dominios C2 unen tres iones Ca^{2+} y los efectos protectores totales a concentraciones altas de Ca^{2+} y fosfolípidos son similares, las diferencias encontradas en cuanto a la afinidad por Ca^{2+} y en cuanto a las características del proceso de estabilización frente a la desnaturalización observadas en presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos, pueden indicar que existen diferencias en el comportamiento de cada dominio. Este distinto comportamiento podría relacionarse con la elevada especialización de cada isoenzima clásica de la PKC. De esta forma, nuestro trabajo supone un acercamiento al estudio de la relación entre la estructura y la función de estas proteínas. La elevada especialización de las isoenzimas clásicas de la PKC se pone de manifiesto, por ejemplo, en su diferente distribución tanto a nivel celular como a nivel tisular (Nishizuka, 1992), así como en su distinto nivel de expresión en cada tipo celular (Ohno y col., 1991; Dekker y Parker, 1994; Dempsey y col., 2000), como se comentó en Capítulos anteriores de esta misma Memoria.

No obstante, quedarían algunas incógnitas por resolver en el futuro, como intentar dilucidar la interacción del Ca^{2+} con el dominio en presencia de fosfolípido por ITC, o estudiar el enlace a Ca^{2+} de los distintos dominios mediante esta técnica a diferentes temperaturas para poder determinar la relación con la capacidad calorífica ΔC_p . Asimismo, sería interesante poder determinar, identificar y estudiar las distintas poblaciones de proteína que componen las complejas transiciones obtenidas mediante DSC en presencia de los ligandos.

Capítulo VI

Análisis de la estructura
secundaria de los dominios C2
de la PKC α , β II y γ .

1. RESUMEN.

Se estudió la estructura secundaria de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC α , la PKC β II y la PKC γ en distintas condiciones experimentales utilizando la espectroscopía de infrarrojo. Como ligandos de la proteína se usaron Ca^{2+} y fosfolípidos para estudiar los distintos efectos producidos en la estructura de las proteínas tras su enlace, así como su influencia en la desnaturalización térmica de las mismas. Los mayores cambios en la estructura se observaron tras la adición y enlace a fosfolípidos. La estructura secundaria de los tres dominios resultó ser muy similar a 25°C, tanto en ausencia como en presencia de ligandos. En cambio, se encontraron algunas diferencias en la estructura secundaria de los tres dominios tras el calentamiento de las proteínas en presencia de los ligandos, de manera que el dominio C2 de la PKC γ presentó una mayor protección frente a la desnaturalización térmica que el dominio C2 de la PKC α y éste, a su vez, mayor que el dominio C2 de la PKC β II.

Adicionalmente se llevó a cabo un estudio de correlación bidimensional para analizar con mayor detalle las diferencias existentes entre los tres dominios C2 durante el proceso de desnaturalización térmica en ausencia de ligandos. Así, la correlación bidimensional sincrona mostró que los cambios más importantes ocurrieron en la región correspondiente a la agregación de la hoja β de la proteína desnaturalizada (1616-1619 cm^{-1}). Esta señal presentó una fuerte correlación con la componente de la hoja β (1636-1636 cm^{-1}) en los tres dominios C2. Por otro lado, la correlación bidimensional asincrona nos permitió establecer el orden secuencial de los diferentes sucesos estudiados, de manera que para los tres dominios, el aumento de la agregación de la proteína desnaturalizada tuvo lugar después de cambios en otras componentes estructurales, lo cual puede explicarse por el importante papel que presenta el sándwich β compacto característico de la estructura del dominio C2.

Todas estas diferencias observadas entre estos tres dominios C2 pueden estar relacionadas con la elevada especialización y localización fisiológica en los distintos tipos celulares de las distintas isoenzimas clásicas de la PKC.

2. INTRODUCCIÓN.

La subfamilia de las isoenzimas clásicas de la PKC (α , β I, β II y γ) se caracteriza por presentar en la región reguladora de la proteína los dominios conservados C1 y C2. De esta manera, diacilgliceroles (DAG), ésteres de forbol, Ca^{2+} y fosfolípidos aniónicos modulan la actividad de estas enzimas (Mellor y Parker, 1998; Hoffmann, 1997; Nishizuka, 1995).

Los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC comparten la estructura modelo de un motivo que consiste en ocho cadenas β antiparalelas agrupadas en dos hojas de cuatro cadenas cada una formando un sándwich β compacto y presentan una topología tipo I (Sutton y Sprang, 1998; Pappa y col., 1998; Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). Los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC unen Ca^{2+} y fosfolípidos. La unión de la PKC a la membrana dependiente de Ca^{2+} requiere fosfolípidos aniónicos (Bazzi y Neselstuen, 1990; Luo y col., 1993) y está mediada por el dominio C2 (Edwards y Newton, 1997a; Medkova y Cho, 1998a).

Mediante la resolución de la estructura tridimensional de los dominios C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y PKC β I (Pappa y col., 1998), se ha podido identificar los residuos que establecen la interacción con los distintos ligandos. De esta forma, en el enlace a Ca^{2+} intervienen una serie de residuos localizados en unos lazos situados en uno de las caras del dominio C2 (Sutton y Sprang, 1998; Pappa y col., 1998; Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). Se han identificado dos o tres iones Ca^{2+} enlazados a los dominios C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998). Por otro lado, los fosfolípidos aniónicos se unen al dominio C2 de la PKC α en dos localizaciones distintas. Una de ellas se encuentra en el sitio de unión a Ca^{2+} , donde un ión Ca^{2+} actúa de puente en la interacción (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). La otra zona donde los fosfolípidos aniónicos pueden interaccionar con el dominio C2 se localiza en las proximidades de la región rica en Lys entre las cadenas β 3 y β 4 (Ochoa y col., 2002).

Las isoenzimas clásicas de la PKC presentan características estructurales y enzimáticas similares, a pesar de que se expresan a distintos niveles y se distribuyen de manera específica en los diferentes tejidos y tipos celulares (Ohno y col., 1991; Dempsey y col., 2000). Así, por ejemplo, mientras la PKC α se encuentra en todos los tipos celulares, la PKC β I y la PKC β II se expresan en algunos tejidos y la PKC γ aparece únicamente en el sistema nervioso central (Nishizuka, 1992).

A pesar de la elevada homología de secuencia existente entre los dominios C2 de las diferentes isoenzimas clásicas (ver Figura IV.1 del Capítulo IV de esta Memoria), parece existir un determinado grado de especialización respecto a la función de las distintas isoenzimas. Además, el hecho de que se activen mediante distintas concentraciones de Ca²⁺ y mediante membranas con diferentes composiciones lipídicas, lleva a pensar que deben existir algunas características estructurales específicas.

En este trabajo, se ha utilizado la espectroscopia de IR unidimensional y bidimensional para estudiar las diferencias en la estructura secundaria en disolución de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC (α , β II y γ), así como los efectos de la unión de Ca²⁺ y lípido sobre dicha estructura secundaria y el comportamiento de los mismos durante la desnaturalización térmica. Nuestros resultados muestran que existen algunas diferencias significativas en cuanto a la estructura secundaria de los tres dominios y que esas diferencias pueden establecer las bases para su distinta interacción con Ca²⁺ y fosfolípidos. Además, el distinto comportamiento mostrado frente a la desnaturalización térmica puede reflejar los movimientos del esqueleto de las proteínas, lo cual tiene un gran interés a la hora de intentar entender la diferente funcionalidad de las distintas isoenzimas. Por otro lado, la espectroscopia bidimensional permitió profundizar en el análisis de los acontecimientos ocurridos durante el proceso de desnaturalización. De esta manera, la aplicación de esta técnica relativamente moderna y los resultados que ofrece demuestra su enorme utilidad a la hora de realizar estudios estructurales de proteínas.

3. RESULTADOS.

3.1. Estudios de la estructura secundaria mediante FT-IR.

3.1.1. Estructura secundaria en ausencia de ligandos.

Se estudiaron las estructuras secundarias de las isoenzimas clásicas α , β II y γ de la PKC mediante espectroscopía de infrarrojo. La descomposición de la banda amida I' de la forma nativa de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ a 25°C, preparadas en los correspondientes tampones con agua deuterada en presencia de 0,2 mM EGTA (ausencia de Ca²⁺), se muestran en la Figura VI.1. El número de componentes, así como su posición inicial se obtuvieron mediante la aplicación de la desconvolución y la derivación de los espectros (Figura VI.1D). La contribución cuantitativa de cada componente a la banda amida I' total se calculó a través del ajuste de bandas del espectro original utilizando el programa Grams/32 (Galactic Industries Corp., Salem, NH, E.E.U.U.). Los parámetros (posición y porcentaje de área total de cada una de las componentes espectrales, con su asignación estructural) resultantes de los ajustes de los tres dominios C2 a 25°C y en ausencia de ligandos se muestran en la Tabla VI.1.

Los espectros de los dominios C2 de estas tres isoenzimas clásicas de la PKC son muy similares entre sí y todos muestran siete componentes en la región de la banda amida I' entre 1700-1600 cm⁻¹. La componente principal aparece en la posición 1632-1634 cm⁻¹ y se debe claramente a las vibraciones intramoleculares C=O de las hojas β (Krimm y Bandekar, 1986; Susi y Byler, 1987; Arrondo y col., 1989; Fabian y col., 1992; Arrondo y col., 1994b; González y col., 1997; Zhang y col., 1998). La componente de alta frecuencia situada a 1674-1676 cm⁻¹ puede asignarse a la estructura de hoja β antiparalela (Arrondo y col., 1989; Muga y col., 1993). En conjunto, estas dos componentes de hoja β sumaron un 58-59% del área total de la banda amida I'. La componente a 1653-1654 cm⁻¹ se asigna a hélice α y supuso un 12-14% de la estructura total para los tres dominios C2.

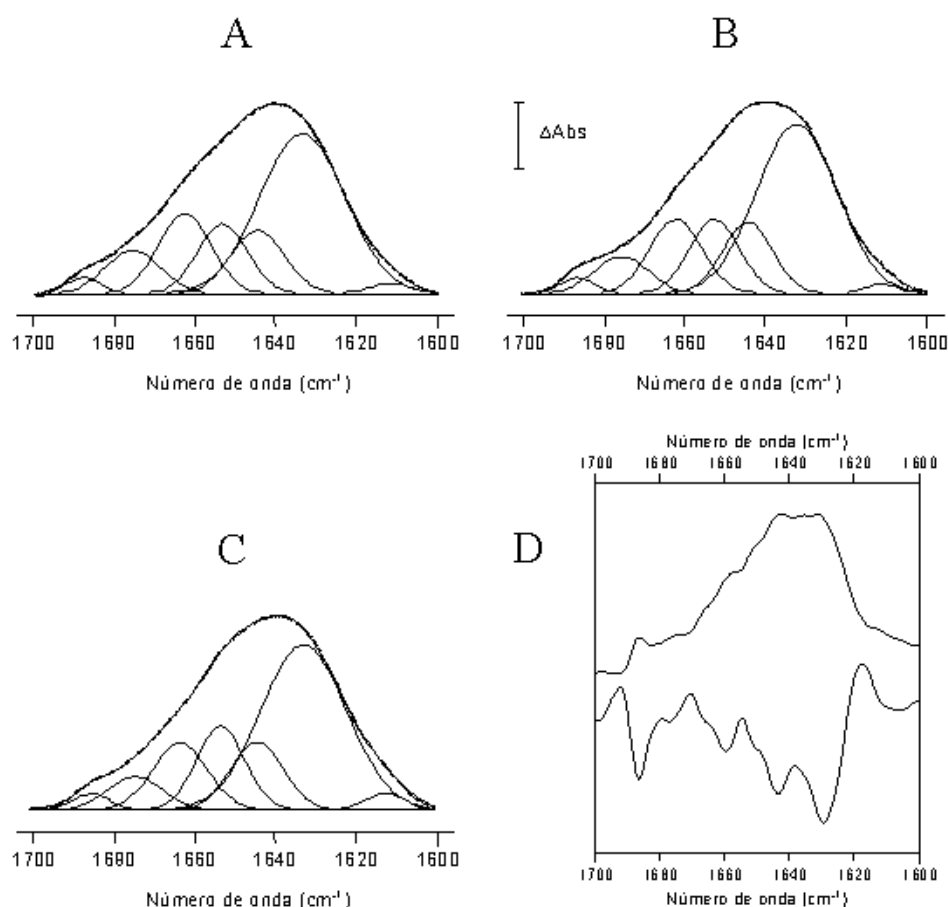


Figura VI.1. Espectros de FT-IR de dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a 25°C. Se muestran los espectros de FT-IR de los dominios C2 de la PKC α (A), PKC β II (B) y la PKC γ (C) en la región amida I' a 25°C en tampón D₂O con las bandas componentes ajustadas. Estos tampones fueron Hepes 25 mM pD 7,4, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM para el dominio C2 de la PKC α , MOPS 20 mM pD 6,8, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM para el dominio C2 de la PKC β II y Tris-HCl 25 mM pD 8,0, NaCl 100 mM y EGTA 0,2 mM para el dominio C2 de la PKC γ . Las proteínas se incubaron a 4°C durante toda la noche para maximizar el intercambio H-D. La concentración de las proteínas fue aproximadamente 8 mg/ml. El incremento de las unidades de absorbancia (Δ Abs) fue 0,02. Los espectros de infrarrojo se recogieron utilizando un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Bruker modelo Vector 22 equipado con un detector MCT. La cámara del espectrofotómetro se purgó continuamente con aire seco para evitar que el vapor de agua de la atmósfera interfiriese con las bandas de interés. Las muestras se examinaron en una célula termostatazada Specac 20710 (Specac, Kent, Inglaterra), equipada con ventanas de CaF₂ y espaciadores de teflón de 25 μ m. Cada espectro se obtuvo mediante la acumulación de 128 barridos con una resolución nominal de 2 cm^{-1} y a continuación se llevó a cabo la transformada de Fourier utilizando una función de apodización triangular. El número, la posición, la anchura y la intensidad de cada componente individual se estimaron inicialmente mediante la desconvolución y la derivación del espectro original utilizando el programa Grams/32. La desconvolución de Fourier (espectro superior en D) se realizó utilizando una función de suavizado tipo Bessel, con forma Lorentziana, con un factor γ 10 y una anchura a media altura de 20 cm^{-1} . La derivada de Savitzki-Golay (espectro inferior en D) de segundo grado se calculó con 7-13 cm^{-1} de suavizado. Después se realizó el ajuste de la curva y los valores de la altura, las anchuras y posiciones de cada banda se fueron optimizando sucesivamente hasta llegar al ajuste final. Las áreas fraccionarias de las componentes de la región amida I' se calcularon a partir de las áreas de las bandas ajustadas. Los parámetros correspondientes a estas componentes aparecen reflejados en la Tabla VI.1. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original.

Tabla VI.1. Parámetros de FT-IR de las componentes de la banda amida I' de las isoenzimas clásicas de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ en los tampones correspondientes de D₂O en presencia de EGTA 0,2 mM a 25°C y 80°C.

Asignación	25°C						80°C					
	Dominio C2 de la PKC α		Dominio C2 de la PKC β II		Dominio C2 de la PKC γ		Dominio C2 de la PKC α		Dominio C2 de la PKC β II		Dominio C2 de la PKC γ	
	Posición (cm ⁻¹)	Área ^b (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)
Giros β	1688	2	1687	2	1688	2	1679	13	1679	10	1679	11
Hoja β agregada												
Hoja β antiparalela	1676	9	1675	8	1674	8	1667	8	1667	9	1667	9
Giros β	1663	15	1662	14	1663	13	1667	8	1667	9	1667	9
Hélice α	1654	12	1653	13	1653	14	1657	10	1657	11	1657	11
Desordenada	1644	12	1644	13	1644	13	1644	42	1643	37	1644	37
Hoja β	1634	50	1632	50	1632	50	1630	5	1630	9	1631	11
Hoja β agregada							1619	22	1619	24	1619	21

^aPosición de los picos de las componentes de la banda amida I'. ^bÁrea porcentual de las componentes de la banda amida I'. El área correspondiente a la contribución de las cadenas laterales localizadas entre 1610 - 1615 cm⁻¹ no se han tenido en cuenta.

La banda cercana a 1644 cm⁻¹ se puede atribuir a conformaciones con estructura desordenada (Susi y col., 1967; Fabian y col., 1992) y constituyó un 12-13% del área total de la banda amida I'. Las bandas localizadas a 1662-1663 cm⁻¹ y 1687-1688 cm⁻¹ provienen de giros β (Arrondo y col., 1989; Muga y col., 1993) y en conjunto sumaron un 15-17% del área total. Finalmente, la banda en torno a 1610-1615 cm⁻¹ se atribuye a la absorción de las cadenas laterales (Susi y col., 1967; Bandekar, 1992; Cladera y col., 1992) y su aportación no fue incluida en el cálculo de la estructura secundaria de los dominios C2. Como se puede observar de la descomposición de los espectros de los tres dominios C2 (Figura VI.1), así como de los valores del ajuste de dicha descomposición (Tabla VI.1), se obtuvieron resultados muy similares para las estructuras secundarias de los tres dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ , en ausencia de ligandos a 25°C, con pequeñas diferencias de sólo 1-2% en algunas componentes que pueden deberse al error experimental.

El procedimiento utilizado en nuestros experimentos para calcular cuantitativamente la estructura secundaria de los dominios C2 presenta típicamente un error de aproximadamente 1% (Arrondo y col., 1994a). No obstante, en nuestro caso, mediante la comparación de los ajustes de, al menos, tres experimentos independientes y la repetición del proceso realizado por tres personas diferentes, se

concluyó que el error experimental fue aproximadamente 1-2%, de forma que se consideraron como significativos los cambios estructurales mayores a 4%.

Para poder aclarar si existen cambios estructurales sutiles entre los tres dominios C2, se llevaron a cabo estudios de la estabilidad térmica de los dominios que mostraron importantes cambios en el desplegamiento de las proteínas durante este proceso. En ausencia de Ca^{2+} , estos cambios en la estructura secundaria de los tres dominios C2 a 80°C (Figura VI.2) incluyeron un ensanchamiento de la banda amida I' y la aparición de dos componentes bien definidas a 1619 cm^{-1} y a 1679 cm^{-1} , las cuales son características de proteínas desnaturizadas térmicamente (Arrondo y col., 1989; Surewicz y col., 1990). Estas componentes indican que se produjo una agregación en las proteínas desplegadas como consecuencia de una desnaturalización térmica irreversible (Susi, 1972; Surewicz y col., 1990; Arrondo y col., 1994a).

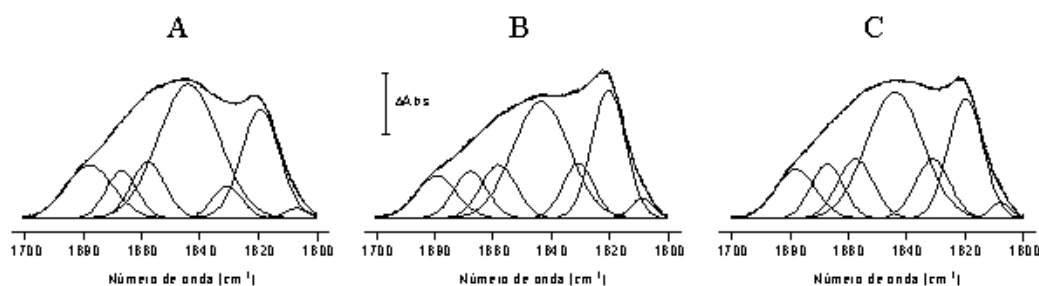


Figura VI.2. Espectros de FT-IR de dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a 80°C. Se muestran los espectros de FT-IR de los dominios C2 de la PKC α (A), PKC β II (B) y la PKC γ (C) en la región amida I' a 80°C en tampón D_2O con las bandas componentes ajustadas. Los tampones utilizados fueron los mismos que en el caso del análisis de la estructura secundaria a 25°C. El procedimiento para la obtención de los espectros y su procesamiento para llevar a cabo el ajuste de las bandas componentes fue el mismo que en el caso anterior (ver Figura VI.1). La concentración de las proteínas fue aproximadamente 8 mg/ml. El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) es 0,02. Los parámetros correspondientes a las bandas componentes de la región amida I' aparecen reflejados en la Tabla VI.1. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original.

Además de la aparición de las componentes a 1619 cm^{-1} y 1679 cm^{-1} , destacan otros cambios en la estructura de la proteína como consecuencia de la desnaturalización térmica, tal y como se puede observar en la Tabla VI.1. Los espectros correspondientes a los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la

PKC γ a 80°C muestran como componente principal una banda situada a 1643-1644 cm^{-1} que se corresponde con la estructura desordenada y representa el 42% del área total para el dominio C2 de la isoenzima α y el 37% para los de las isoenzimas β II y γ (Tabla VI.1). La banda a 1630-1631 cm^{-1} correspondiente a la estructura de hoja β sufre dos cambios importantes respecto al espectro a 25°C: un descenso importante en cuanto a su contribución (cae hasta un 5%, un 9% y un 11% del área relativa para las isoenzimas α , β II y γ , respectivamente) y un ligero cambio en la posición del máximo de esta componente desde 1632-1634 cm^{-1} a 25°C hasta 1630-1631 cm^{-1} a 80°C. Algo similar le ocurrió a la componente de los giros β , que en este caso apareció a 1667 cm^{-1} (a 25°C se encontraba en 1662-1663 cm^{-1}) y supuso un 8-9% del área total, indicando que parte de este tipo de estructura disminuye pero permanece después de la desnaturalización, como se ha mostrado en otros casos (Arrondo y col., 1994a). Además, es interesante destacar el hecho de que la componente correspondiente a la hélice α , localizada a 1657 cm^{-1} (a 25°C se encontraba a 1653-1654 cm^{-1}) se mantuvo después del calentamiento, suponiendo el 10-11% del área total.

Así, parece ser que la desnaturalización térmica de los dominios C2 de las tres isoenzimas se caracteriza por la agregación irreversible y el desplegamiento de la estructura de la hoja β para dar lugar a una estructura más desordenada que consiste principalmente en estructuras agregadas de la hoja β que aparecen a 1619 cm^{-1} y a 1679 cm^{-1} . Por lo tanto, a pesar de la elevada similitud en la estructura secundaria de los tres dominios C2 a 80°C, se pueden apreciar ciertas peculiaridades, siendo la más destacada el hecho de que el aumento de la componente de estructura desordenada a 1643 cm^{-1} es menor para los dominios C2 de la PKC β II y de la PKC γ , lo cual está asociado a una mayor presencia de la componente de hoja β localizada a 1630-1631 cm^{-1} .

La Figura VI.3 muestra una visión tridimensional de los distintos espectros desconvueltos de los tres dominios durante el proceso de calentamiento en ausencia de ligandos, de forma que los cambios ocurridos durante el mismo (principalmente la aparición de las componentes a 1619 y 1679 cm^{-1} , características de la agregación) se pueden apreciar con mayor claridad.

No obstante, estos diferentes perfiles de desnaturalización podrían reflejar distintos movimientos del esqueleto proteico de los tres dominios, de forma que estarían más relacionados con procesos dinámicos que con cambios estructurales.

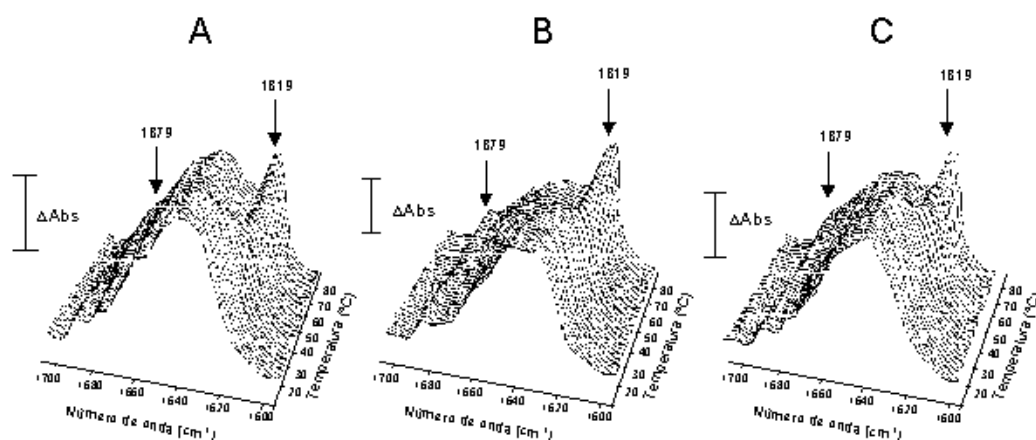


Figura VI.3. Espectros desconvueltos de FT-IR de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC en función de la temperatura en ausencia de ligandos. Se muestran los espectros desconvueltos de los dominios C2 de la PKC α (A), de la PKC β II (B) y de la PKC γ (C), en sus tampones correspondientes en D₂O y en ausencia de ligandos, en la región amida I' (1700-1600 cm^{-1}) en función de la temperatura desde 25 $^{\circ}C$ hasta 80 $^{\circ}C$. La obtención de estos espectros desconvueltos se realizó como se comenta en el caso del análisis de la estructura secundaria (ver Figura VI.1). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue de 0,04. Se destacan las posiciones de las componentes características de la agregación, localizadas a 1619 cm^{-1} y a 1679 cm^{-1} .

3.1.2. Estructura secundaria en presencia de Ca²⁺.

A continuación se estudió el efecto de la unión de Ca²⁺ sobre la estructura secundaria de estos tres dominios C2. Se utilizaron dos concentraciones de Ca²⁺, 2 mM y 12 mM, las cuales suponen, teniendo en cuenta las condiciones experimentales, unas relaciones molares ($[Ca^{2+}]/proteína$) de aproximadamente 4:1 y 24:1, respectivamente, y, a su vez, una situación no saturante y completamente saturante.

3.1.2.1. Estructura secundaria en presencia de Ca²⁺ a 25 $^{\circ}C$.

Los espectros de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ a 25 $^{\circ}C$ en sus correspondientes tampones con D₂O y en presencia de CaCl₂ 2 mM y

CaCl_2 12 mM (Figura VI.4) resultaron muy similares a los descritos anteriormente para las mismas proteínas en ausencia de Ca^{2+} y a la misma temperatura, tanto a nivel del número de bandas, como en cuanto a su posición y área relativa, tal y como se muestra en las Tablas VI.2 y VI.3.

Tabla VI.2. Parámetros de FT-IR de las componentes de la banda amida I' de las isoenzimas clásicas de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ en los tampones correspondientes de D_2O en presencia de Ca^{2+} 2 mM a 25°C y 80°C.

Asignación	25°C						80°C					
	Dominio C2 de la PKC α		Dominio C2 de la PKC β II		Dominio C2 de la PKC γ		Dominio C2 de la PKC α		Dominio C2 de la PKC β II		Dominio C2 de la PKC γ	
	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)
Gros β	1688	3	1687	2	1688	3						
Hoja β agregada							1679	14	1679	10	1679	13
Hoja β antiparalela	1675	9	1676	7	1676	9						
Gros β	1662	15	1663	14	1664	14	1666	9	1667	8	1667	10
Hélice α	1654	12	1654	14	1655	14	1657	10	1657	10	1657	13
Desordenada	1644	12	1644	13	1645	12	1644	39	1643	38	1645	34
Hoja β	1635	49	1634	50	1633	48	1632	9	1630	10	1631	18
Hoja β agregada							1620	19	1619	24	1619	12

3.1.2.2. Estructura secundaria en presencia de Ca^{2+} a 80°C.

En otra serie de experimentos se estudiaron los efectos de la presencia de esta concentración de Ca^{2+} no saturante (2 mM) o bien saturante (12 mM) sobre la desnaturalización térmica de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC.

De esta manera, cuando se analizaron los cambios en las componentes estructurales derivados de la desnaturalización térmica a 80°C debido al efecto del Ca^{2+} , se observó que la presencia de Ca^{2+} 2 mM (Figura VI.5 y Tabla VI.2) produjo una reducción del área de las componentes a 1619 cm^{-1} (hoja β agregada) y a 1643-1645 cm^{-1} (estructura desordenada) para los dominios C2 de la PKC α y de la PKC γ , pero no para la isoenzima β II. En el caso de la componente correspondiente a la agregación de la hoja β (1619 cm^{-1}), esta reducción fue sensiblemente importante para el dominio C2 de la PKC γ , ya que su contribución disminuyó casi a la mitad respecto a la ausencia de Ca^{2+} a la misma temperatura (del 21% al 12%), pero más moderada en el caso del dominio C2 de la PKC α (descendió desde un 22% en ausencia de Ca^{2+} a un 19% en presencia de Ca^{2+} 2 mM). Por otro lado, la aparición

de la componente de estructura desordenada (1643-1645 cm^{-1}) fue mucho más moderada, descendiendo un 3% en los casos de los dominios C2 de la PKC α y de la PKC γ , mientras que en el caso del dominio C2 de la PKC β II se mantuvo aproximadamente igual que en ausencia de Ca^{2+} a esta temperatura. Asociada a la reducción de la importancia de las componentes de agregación y estructura desordenada, se observó también un aumento en la hoja β a 1630-1632 cm^{-1} . De nuevo fue en los dominios C2 de la PKC α y de la PKC γ donde más se pudo apreciar este efecto, de forma que para el primero la hoja β alcanzó una contribución del 9% (5% en ausencia de Ca^{2+} a esta temperatura), mientras que el segundo presentó un 18% de esta estructura (11% en ausencia de Ca^{2+} a la misma temperatura).

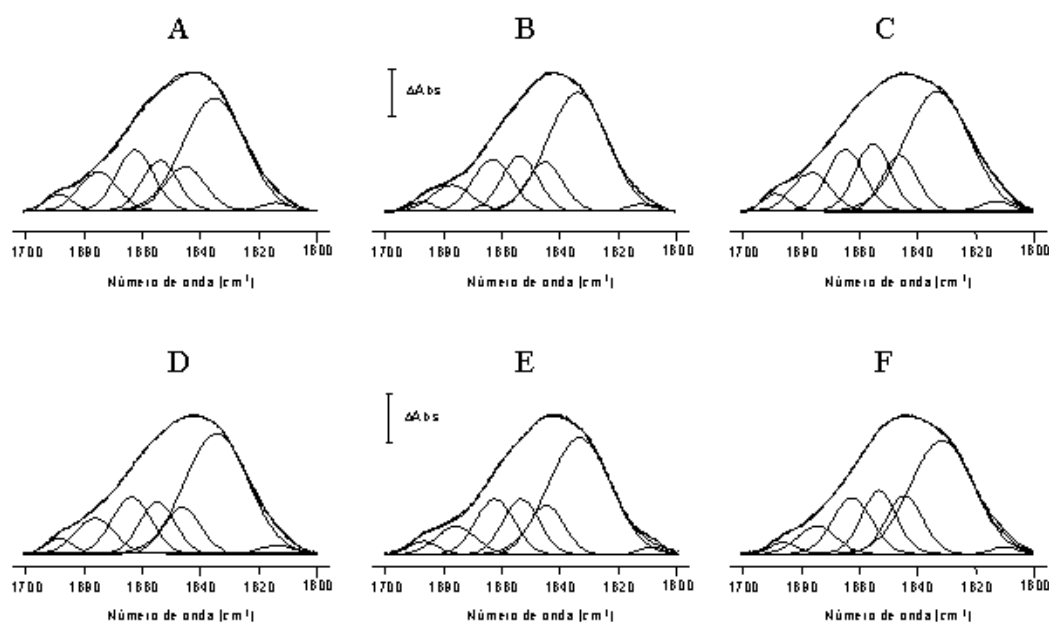


Figura VI.4. Espectros de FT-IR de dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a 25°C en presencia de distintas concentraciones de Ca^{2+} . Se muestran los espectros de FT-IR de los dominios C2 de la PKC α (A y D), PKC β II (B y E) y la PKC γ (C y F) en la región amida I' a 25°C en tampón D_2O con las bandas componentes ajustadas, y en presencia de Ca^{2+} 2 mM (A, B y C) y Ca^{2+} 12 mM (D, E y F). Los tampones utilizados fueron los mismos que en el caso del análisis de la estructura secundaria a 25°C. El procedimiento para la obtención de los espectros y su procesamiento para llevar a cabo el ajuste de las bandas componentes fue el mismo que en el caso anterior (ver Figura VI.1). La concentración de las proteínas fue aproximadamente 8 mg/ml. El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) es 0,02. Los parámetros correspondientes a las bandas componentes de la región amida I' aparecen reflejados en las Tablas VI.2. y VI.3. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original.

Tabla VI.3. Parámetros de FT-IR de las componentes de la banda amida I' de las isoenzimas clásicas de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ en los tampones correspondientes de D₂O en presencia de Ca²⁺ 12 mM a 25°C y 80°C.

Asignación	25°C						80°C					
	Dominio C2 de la PKC α		Dominio C2 de la PKC β II		Dominio C2 de la PKC γ		Dominio C2 de la PKC α		Dominio C2 de la PKC β II		Dominio C2 de la PKC γ	
	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)
Gros β	1688	3	1687	2	1686	3					1688	2
Hoja β agregada							1679	13	1679	10		
Hoja β antiparalela	1676	9	1676	8	1674	8					1676	8
Gros β	1663	15	1663	15	1662	14	1666	9	1667	8	1664	15
Hélice α	1655	12	1654	14	1653	14	1657	10	1657	12	1655	14
Desordenada	1644	11	1645	12	1644	14	1644	35	1644	39	1645	14
Hoja β	1634	5.0	1634	49	1631	47	1631	16	1630	12	1633	47
Hoja β agregada							1618	17	1619	19		

En resumen, se puede concluir que la adición de esta concentración no saturante de Ca²⁺ (2 mM) apenas produjo cambios estructurales importantes a 80°C en el caso del dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.5B y Tabla VI.2), mientras que sí los hubo en los dominios C2 de la PKC α (Figura VI.5A y Tabla VI.2) y de la PKC γ (Figura VI.5C y Tabla VI.2), siendo esta última quien se mostró más sensible a la adición de esta concentración de Ca²⁺. Estas diferencias demuestran que el efecto protector de la unión de Ca²⁺ a los dominios frente a la desnaturalización térmica resultó ser más efectivo en el caso del dominio C2 de la PKC γ y menos efectivo para el dominio C2 de la PKC β II.

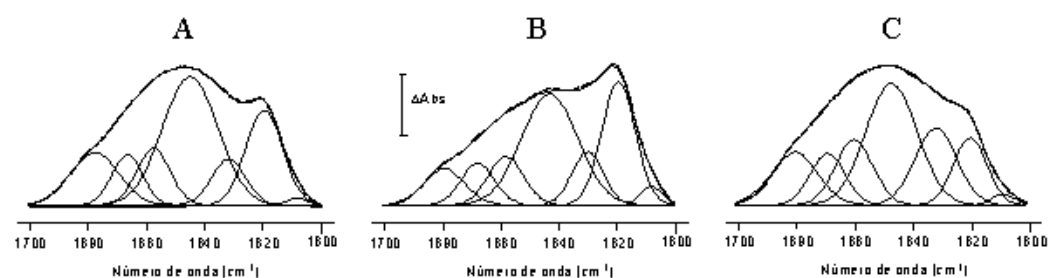


Figura VI.5. Espectros de FT-IR de dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a 80°C en presencia de Ca²⁺ no saturante. Se muestran los espectros de FT-IR de los dominios C2 de la PKC α (A), PKC β II (B) y la PKC γ (C) en la región amida I' a 80°C en tampón D₂O con las bandas componentes ajustadas, y en presencia de Ca²⁺ 2 mM. Los tampones utilizados fueron los mismos que en el caso del análisis de la estructura secundaria a 25°C. El procedimiento para la obtención de los espectros y su procesamiento para llevar a cabo el ajuste de las bandas componentes fue el mismo que en el caso anterior (ver Figura VI.1). La concentración de las proteínas fue aproximadamente de 8 mg/ml. El incremento de las unidades de absorbancia (Δ Abs) es 0,02. Los parámetros correspondientes a las bandas componentes de la región amida I' aparecen reflejados en la Tabla VI.2. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original.

Este hecho queda también reflejado claramente en la representación tridimensional de los distintos espectros desconvueltos obtenidos durante el calentamiento de los tres dominios C2 en presencia de CaCl₂ 2 mM (Figura VI.6), donde se puede apreciar que la componente característica de la desnaturalización situada a 1619 cm⁻¹ aproximadamente apareció a 55°C en el caso del dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.6B), a 60°C para el caso del dominio C2 de la PKC α (Figura VI.6A) y a 70°C en el caso del dominio C2 de la PKC γ (Figura VI.6C). No obstante, estos diferentes perfiles de desnaturalización en presencia de Ca²⁺ 2 mM podrían reflejar distintos movimientos del esqueleto proteico de los tres dominios, de forma que estarían más relacionados con procesos dinámicos que con cambios estructurales, como ya se comentó anteriormente.

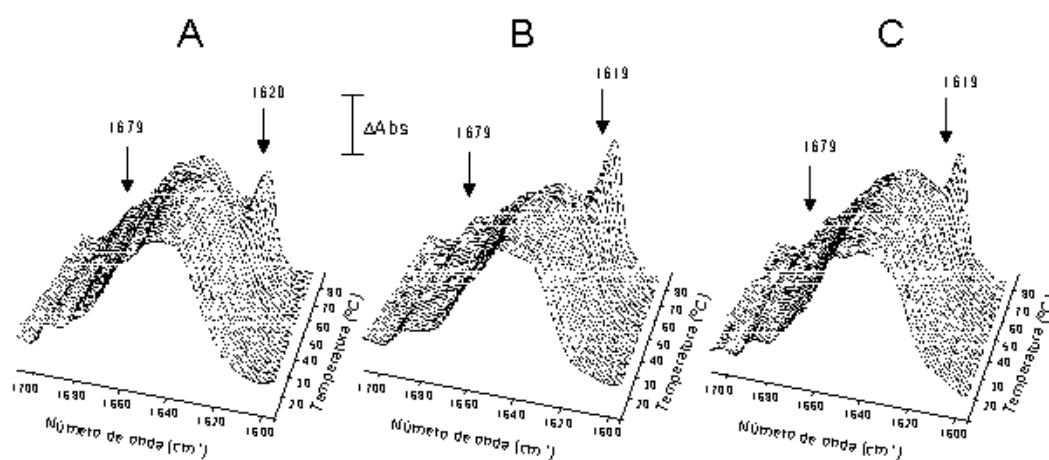


Figura VI.6. Espectros desconvueltos de FT-IR de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC en función de la temperatura en presencia de Ca²⁺ 2 mM. Se muestran los espectros desconvueltos de los dominios C2 de la PKC α (A), de la PKC β II (B) y de la PKC γ (C), en sus tampones correspondientes en D₂O, en la región amida I (1700-1600 cm⁻¹) en función de la temperatura desde 25°C hasta 80°C, en presencia de 2 mM Ca²⁺. La obtención de estos espectros desconvueltos se realizó como se comenta en el caso del análisis de la estructura secundaria (ver Figura VI.1). El incremento de las unidades de absorbancia (Δ Abs) fue de 0,02.

El efecto protector del Ca²⁺ frente a la desnaturalización térmica quedó más patente en la serie de experimentos donde se utilizó una concentración de Ca²⁺ saturante (12 mM). En estas condiciones, el mayor efecto se observó sin duda alguna con el dominio C2 de la PKC γ (Figura VI.7C y Tabla VI.3), ya que la componente a 1619 cm⁻¹ que aparece debido al calentamiento en ausencia de Ca²⁺, ya no se

observa, lo cual sugiere que la unión de Ca^{2+} protege de forma más eficiente a este dominio. Este efecto se confirma con el hecho de que las otras componentes estructurales del espectro permanecen muy similares en cuanto a posición y contribución al área total respecto a las encontradas en la muestra a 25°C .

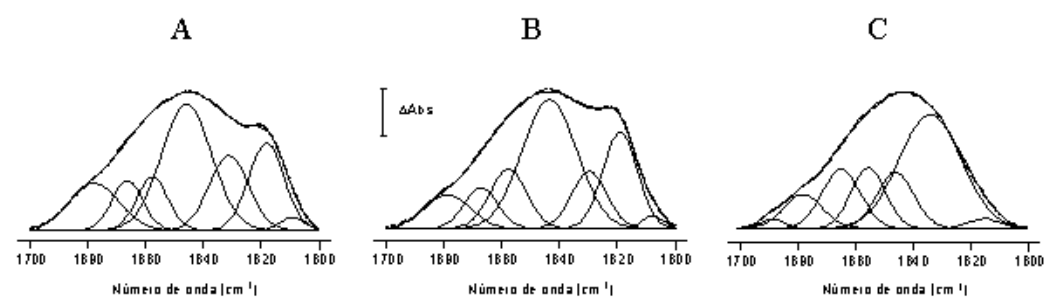


Figura VI.7. Espectros de FT-IR de dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a 80°C en presencia de Ca^{2+} saturante. Se muestran los espectros de FT-IR de los dominios C2 de la PKC α (A), PKC β II (B) y la PKC γ (C) en la región amida I' a 80°C en tampón D_2O con las bandas componentes ajustadas, y en presencia de Ca^{2+} 12 mM. Los tampones utilizados fueron los mismos que en el caso del análisis de la estructura secundaria a 25°C . El procedimiento para la obtención de los espectros y su procesamiento para llevar a cabo el ajuste de las bandas componentes fue el mismo que en el caso anterior (ver Figura VI.1). La concentración de las proteínas fue aproximadamente 8 mg/ml. El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) es 0,02. Los parámetros correspondientes a las bandas componentes de la región amida I' aparecen reflejados en la Tabla VI.3. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original.

En cuanto a los otros dos dominios C2, y comparando con la ausencia de Ca^{2+} , se observó una reducción en las componentes asociadas a la desnaturalización, tanto a nivel de la agregación de la hoja β ($1618\text{-}1619\text{ cm}^{-1}$), como a nivel de la estructura desordenada (1644 cm^{-1}), así como una mayor presencia de hoja β ($1630\text{-}1631\text{ cm}^{-1}$) a esta elevada temperatura. De esta manera, el dominio C2 de la PKC α a 80°C y en presencia de Ca^{2+} 12 mM (Figura VI.7A y Tabla VI.3) mostró un 17% de agregación de hoja β (1618 cm^{-1}) y un 35% de estructura desordenada (1644 cm^{-1}), cuando en ausencia de Ca^{2+} dichas componentes llegaron hasta un 22% y un 42%, respectivamente. La hoja β (1631 cm^{-1}) alcanzó el 16% mientras que en ausencia de Ca^{2+} sólo llegó al 5%. En el caso del dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.7B y Tabla VI.3), la reducción de las componentes asociadas a la desnaturalización fue

más moderada, de forma que alcanzaron valores de un 19% (agregación de la hoja β a 1619 cm^{-1}) y un 39% (estructura desordenada a 1644 cm^{-1}) en estas condiciones, mientras que en ausencia de Ca^{2+} llegaron hasta el 24% y el 37%, respectivamente. La hoja β sufrió una modesta subida respecto al nivel alcanzado en ausencia de Ca^{2+} (un 12% en presencia de Ca^{2+} 12 mM frente al 9% sin este ión).

Este efecto protector del Ca^{2+} sobre la estructura secundaria de los dominios C2 frente a la desnaturalización térmica también queda reflejado en la representación tridimensional de los distintos espectros desconvueltos obtenidos durante el calentamiento en presencia de CaCl_2 12 mM (Figura VI.8), donde se puede apreciar que la componente característica de la desnaturalización situada en 1619 cm^{-1} aproximadamente apareció a 75°C en el caso de los dominios C2 de la PKC α (Figura VI.8A) y de la PKC β II (Figura VI.8B), mientras que no se observa para el caso del dominio C2 de la PKC γ (Figura VI.8C). De nuevo, como en los casos anteriores, estos diferentes perfiles de desnaturalización podrían reflejar distintos movimientos del esqueleto proteico de los tres dominios, estando relacionados con procesos dinámicos.

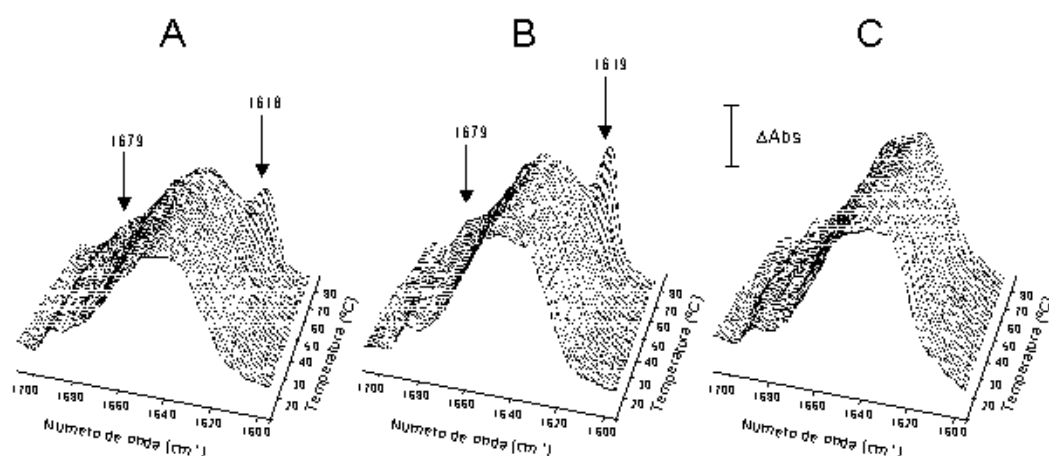


Figura VI.8. Espectros desconvueltos de FT-IR de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC en función de la temperatura en presencia de Ca^{2+} 12 mM. Se muestran los espectros desconvueltos de los dominios C2 de la PKC α (A), de la PKC β II (B) y de la PKC γ (C), en sus tampones correspondientes en D_2O , en la región amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) en función de la temperatura desde 25°C hasta 80°C , en presencia de Ca^{2+} 12 mM. La obtención de estos espectros desconvueltos se realizó como se comenta en el caso del análisis de la estructura secundaria (ver Figura VI.1). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue de 0,02.

3.1.3. Estructura secundaria en presencia de fosfolípidos y Ca^{2+} .

A continuación se llevó a cabo otra serie de experimentos para estudiar el efecto conjunto de Ca^{2+} y vesículas lipídicas (POPC/POPA, relación molar 1:4) sobre la estructura secundaria y la estabilidad térmica de los dominios C2 de las PKCs clásicas. A pesar de que la fosfatidilserina es el fosfolípido descrito como máximo activador de las isoenzimas clásicas de la PKC, no se pudo utilizar en estos experimentos debido a que absorbe radiación infrarroja en la región donde también lo hace la banda amida I', lo cual provocaría interferencias.

De igual forma que en un trabajo anterior (García-García y col., 1999), en primer lugar se realizaron unos experimentos de filtración en gel para comprobar que los dominios C2 se encontraban unidos a las mezclas lipídicas en las condiciones experimentales de los ensayos de FT-IR. Estos experimentos demostraron que los tres dominios C2 estaban unidos a las vesículas unilamelares pequeñas POPC/POPA (relación molar, 1:4), en presencia de CaCl_2 2 mM (Figura VI.9).

Los espectros de FT-IR de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC en presencia de SUV POPC/POPA (relación molar 1:4) y CaCl_2 2 mM a 25°C (Figura VI.10 y Tabla VI.4) resultaron bastante similares entre sí y mostraron algunos cambios importantes respecto a los mismos en ausencia de ligandos o en presencia sólo de CaCl_2 2 mM y sin vesículas a la misma temperatura.

El efecto más sorprendente fue la importante reducción de la hoja β situada a $1631\text{-}1633\text{ cm}^{-1}$, la cual descendió desde aproximadamente el 48-50%, tanto en ausencia de ligandos, como en presencia de Ca^{2+} 2 mM pero sin fosfolípido, hasta el 36% en presencia de Ca^{2+} 2 mM y SUV. Este fenómeno estuvo acompañado de un aumento en las componentes correspondientes a la estructura desordenada ($1644\text{-}1645\text{ cm}^{-1}$) y a la hélice α ($1655\text{-}1656\text{ cm}^{-1}$). En ausencia de ligandos, la estructura desordenada supuso un 11-14% y su contribución aumentó hasta el 23-24% en presencia de Ca^{2+} y SUV. Por otro lado, la hélice α , que en ausencia de ligandos supuso un 12-14%, aumentó hasta el 16-18% en presencia de Ca^{2+} y SUV.

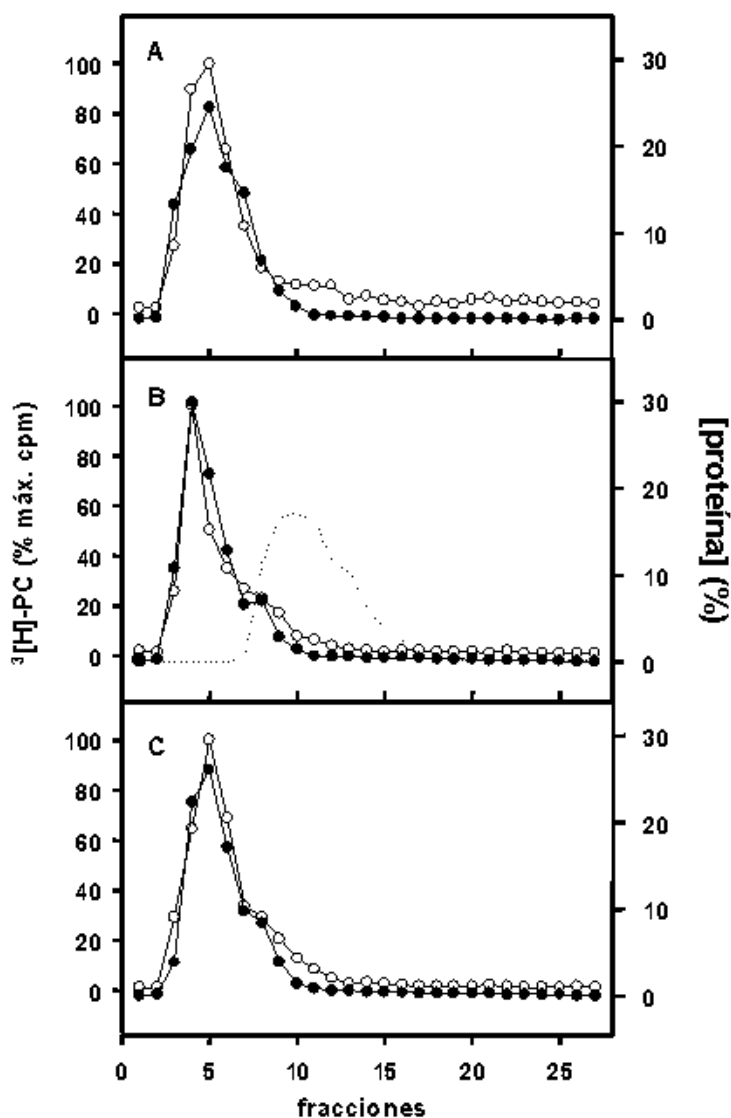


Figura VI.9. Determinación de la unión de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a SUV de POPC/POPA. Esta determinación se llevó a cabo mediante un ensayo de filtración en gel con los dominios C2 de la PKC α (A), de la PKC β II (B) y de la PKC γ (C). Se muestra el perfil de elución del lipido (●) y de las distintas proteínas (○). Asimismo se muestra un experimento control en el panel central llevado a cabo sin fosfolipido (línea discontinua en B). Las muestras contenían 80 μ g del dominio C2 y 400 μ g de vesículas unilamelares pequeñas de POPC/POPA (relación molar 1:4), marcadas con [3 H]DPPC y se incubaron en 100 μ l del tampón correspondiente durante 10 min. Los tampones utilizados Hepes 25 mM pH 7,4, NaCl 100mM y Ca $^{2+}$ 2 mM para el dominio C2 de la PKC α , MOPS 20 mM pH 6,8, NaCl 100 mM y Ca $^{2+}$ 2 mM para el dominio C2 de la PKC β II y Tris-HCl 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM y Ca $^{2+}$ 2 mM para el dominio C2 de la PKC γ . Estas relaciones molares (proteína:lipido:Ca $^{2+}$) fueron las mismas que se utilizaron posteriormente para los ensayos de FT-IR. Las muestras se aplicaron sobre una columna de Sephadex G-100 (1.0 cm \times 2.5 cm) equilibrada con los mismos tampones y se recogieron fracciones de 100 μ l. El perfil de elución del fosfolipido se determinó midiendo la radiactividad presente en cada fracción mediante centelleo líquido y se representó como % de la radiación máxima. El perfil de elución de cada dominio C2 se determinó mediante densitometría utilizando un gel de poliácridamida-SDS al 15% teñido con plata.

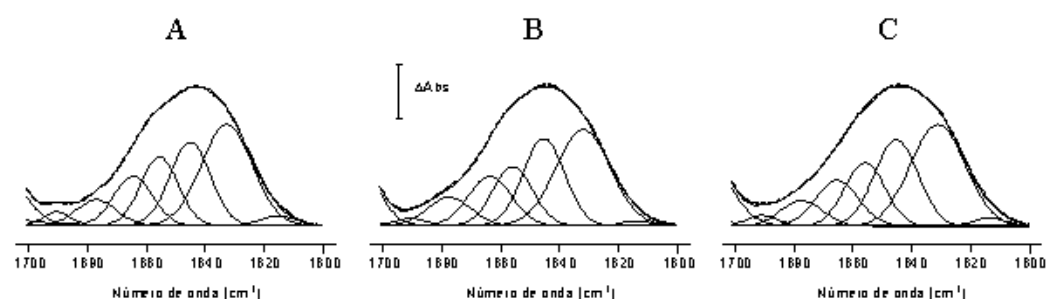


Figura VI.10. Espectros de FT-IR de dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a 25°C en presencia de 2 mM Ca^{2+} y SUV. Se muestran los espectros de FT-IR de los dominios C2 (8mg/ml) de la PKC α (A), PKC β II (B) y la PKC γ (C) en la región amida I' a 25°C en tampón D_2O con las bandas componentes ajustadas, y en presencia de Ca^{2+} 2 mM y SUV (40 mg/ml) compuestas por POPC/POPA (relación molar 1:4). Los tampones utilizados fueron los mismos que en el caso del análisis de la estructura secundaria a 25°C. El procedimiento para la obtención de los espectros y su procesamiento para llevar a cabo el ajuste de las bandas componentes fue el mismo que en el caso anterior (ver Figura VI.1). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) es 0,02. Los parámetros correspondientes a las bandas componentes de la región amida I' aparecen reflejados en la Tabla VI.4. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original.

El calentamiento en presencia de SUV de POPC/POPA (relación molar 1:4) y 2 mM CaCl_2 dio lugar también a resultados interesantes respecto a la ausencia de fosfolípido. Así, en general se puede afirmar que la presencia del fosfolípido protegió sustancialmente frente a la desnaturalización térmica. Las estructuras secundarias de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC α , PKC β II y PKC γ en presencia de 2 mM Ca^{2+} y SUV a 80°C se muestran en la Figura VI.11 y en la Tabla VI.4.

Tabla VI.4. Parámetros de FT-IR de las componentes de la banda amida I' de las isoenzimas clásicas de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ en los tampones correspondientes de D_2O en presencia de Ca^{2+} 2 mM y SUV compuestas por POPC/POPA (relación molar 1:4) a 25°C y 80°C.

Asignación	25°C						80°C					
	Dominio C2 de la PKC α		Dominio C2 de la PKC β II		Dominio C2 de la PKC γ		Dominio C2 de la PKC α		Dominio C2 de la PKC β II		Dominio C2 de la PKC γ	
	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)	Posición (cm $^{-1}$)	Área (%)
Gros β	1690	3	1690	2	1690	3	1692	5	1691	4	1692	4
Hoja β agregada							1679	13	1680	7	1679	8
Hoja β antiparalela	1676	7	1676	8	1676	7						
Gros β	1664	13	1663	14	1665	13	1666	18	1667	17	1667	18
Hélice α	1655	18	1655	16	1656	17	1656	16	1657	14	1657	16
Desordenada	1644	23	1644	24	1645	24	1644	29	1644	36	1645	30
Hoja β	1633	36	1632	36	1631	36	1631	13	1631	11	1631	19
Hoja β agregada							1618	6	1619	11	1619	5

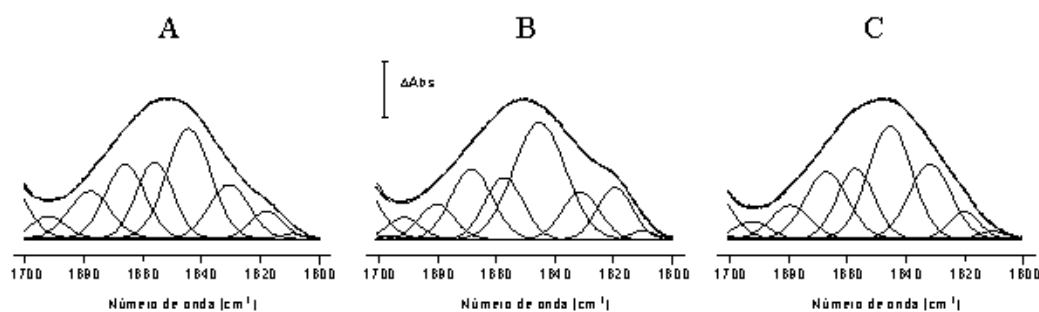


Figura VI.11. Espectros de FT-IR de dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a 80°C en presencia de Ca^{2+} 2 mM y SUV. Se muestran los espectros de FT-IR de los dominios C2 (8mg/ml) de la PKC α (A), PKC β II (B) y la PKC γ (C) en la región amida I' a 80°C en tampón D_2O con las bandas componentes ajustadas, y en presencia de Ca^{2+} 2 mM y SUV (40 mg/ml) compuestas por POPC/POPA (relación molar 1:4). Los tampones utilizados fueron los mismos que en el caso del análisis de la estructura secundaria a 25°C. El procedimiento para la obtención de los espectros y su procesamiento para llevar a cabo el ajuste de las bandas componentes fue el mismo que en el caso anterior (ver Figura VI.1). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) es 0,02. Los parámetros correspondientes a las bandas componentes de la región amida I' aparecen reflejados en la Tabla VI.4. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original.

Los efectos más notables fueron la baja proporción de agregación observada (1618-1619 cm^{-1} y 1679-1680 cm^{-1}) y el mantenimiento de la hélice α (1656-1657 cm^{-1}). De nuevo, los mayores efectos de protección se observaron en el caso del dominio C2 de la PKC γ (Figura VI.11C y Tabla VI.4). Así, la agregación de la hoja β supuso sólo un 5% (1619 cm^{-1}) y un 8% (1679 cm^{-1}), valores mucho menores que los alcanzados en ausencia de ligandos (21% y 11%, respectivamente) o en presencia de Ca^{2+} 2 mM pero sin fosfolípido (12% y 13%, respectivamente). Por otro lado, la hoja β (1631 cm^{-1}) descendió hasta el 19% (36% a 25°C), mientras que la hélice α (1657 cm^{-1}) se mantuvo en los valores iniciales a 25°C (17%). Estos valores fueron mayores que los obtenidos en ausencia de ligandos (11% para ambas estructuras) o en presencia de Ca^{2+} 2 mM, pero sin fosfolípido (18% para hoja β y 13% para la hélice α). Los giros β (1692 cm^{-1} y 1667 cm^{-1}) aumentaron en conjunto respecto a la situación a 25°C (de un 16% a un 22%), llegando a valores superiores que los obtenidos en ausencia de ligandos (9%) y en presencia de Ca^{2+} 2 mM pero sin fosfolípido (10%). Finalmente, la componente de estructura desordenada (1645 cm^{-1}) aumentó ligeramente respecto a la condición inicial de 25°C (pasó de un 24% a un 30%), siendo no obstante inferior a la recogida en ausencia de ligandos (37%) y en presencia de Ca^{2+} 2 mM pero sin fosfolípido (34%).

Este comportamiento fue muy similar al mostrado por el dominio C2 de la PKC α (Figura VI.11A y Tabla VI.4). De nuevo el efecto más notable fue el mantenimiento de la hélice α (1656 cm^{-1}), que en este caso supuso un 16% frente al 18% a 25°C. Tanto en ausencia de ligandos como en presencia de Ca $^{2+}$ 2 mM pero sin fosfolípido, esta componente alcanzó una contribución de un 10%. Por otro lado, la componente atribuida a la agregación de la hoja β (1618 cm^{-1}) sólo alcanzó el 6% frente al 22% de la muestra en ausencia de ligandos o al 19% en presencia de CaCl $_2$ 2 mM pero sin fosfolípido. También fue importante el aumento de las componentes de giros β (1692 cm^{-1} y 1664 cm^{-1}), que en conjunto sumaron un 23%, mientras que a 25°C sólo alcanzaron el 16%. En ausencia de ligandos y en presencia de Ca $^{2+}$ 2 mM pero sin fosfolípido, los giros β supusieron el 8% y el 9%, respectivamente. Además la componente correspondiente a la estructura desordenada (1644 cm^{-1}) alcanzó sólo un 29% en comparación con el 23% a 25°C, o bien con las contribuciones en ausencia de ligandos (42%) o en presencia de Ca $^{2+}$ 2 mM pero sin fosfolípido (39%). También se observó un descenso considerable de la componente correspondiente a la hoja β (1631-1633 cm^{-1}) desde un 36% a 25°C a tan solo el 13% a 80°C, aunque este descenso fue menor que el registrado en la muestra en ausencia de ligandos (5%) o en presencia de CaCl $_2$ 2 mM sin fosfolípido, donde supuso un 9% a 80°C.

El mismo patrón se registró con el dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.11B y Tabla VI.4), aunque en este caso los efectos de la desnaturalización térmica fueron más evidentes. Así, la componente correspondiente a la estructura desordenada (1644 cm^{-1}) aumentó hasta el 36% (29-30% para los otros dominios C2) y agregación de la hoja β (1619 cm^{-1}) aumentó hasta un 11%, en comparación con el 7% de la isoenzima α o con el 5% de la γ . En ausencia de ligandos y en presencia de Ca $^{2+}$ 2 mM pero sin fosfolípido, la componente de estructura desordenada del dominio C2 de la PKC β II supuso un 37% y un 38%, respectivamente. En cambio, la componente localizada a 1680 cm^{-1} , también asociada a agregación, alcanzó un valor (7%) similar al de la isoenzima γ (8%), bastante inferior al del dominio C2 de la PKC α (13%). Esta componente de agregación a 1680 cm^{-1} supuso un 10% tanto en ausencia de ligandos como en presencia de Ca $^{2+}$ 2 mM pero sin fosfolípido a 80°C. La contribución de la hélice α en el dominio C2 de la PKC β II en presencia de Ca $^{2+}$ 2

mM y SUV alcanzó un valor similar al de los otros dos dominios (16% para el dominio C2 de la PKC α y de la PKC γ y 14% para el dominio C2 de la PKC β II).

3.1.4. Estabilidad térmica de los dominios C2.

Para intentar entender mejor el efecto de los distintos ligandos en la desnaturalización térmica de los tres dominios y así también poder compararlos entre ellos, se representó la anchura a media altura de la banda amida I' de los espectros de FT-IR frente a la temperatura (Figura VI.12), la cual se sabe que aumenta durante la desnaturalización térmica (Arrondo y col., 1994a).

En el caso de los espectros del dominio C2 de la PKC α en ausencia de Ca²⁺ (Figura VI.12A), los cambios más importantes en la banda amida I' tuvieron lugar entre 40 y 55°C, donde se produjo el ensanchamiento de la banda. La desnaturalización, vista como el ensanchamiento de la banda amida I', ocurrió a la misma temperatura en el caso del dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.12B). En cambio, el dominio C2 de la PKC γ resultó más resistente frente a la desnaturalización térmica, de forma que el comienzo del ensanchamiento de la banda amida I' comenzó a 45°C (Figura VI.12C).

La adición de CaCl₂ 2 mM produjo el aumento de la temperatura a la que se inició la desnaturalización para los tres dominios. No obstante, mientras en el caso del dominio C2 de la PKC α la temperatura de inicio de la desnaturalización aumentó hasta 60°C (Figura VI.12A), en el caso del dominio C2 de la PKC β II sólo alcanzó los 50°C (Figura VI.12B) y 55°C para el dominio C2 de la PKC γ (Figura VI.12C).

En presencia de CaCl₂ 12 mM, el proceso de desnaturalización comenzó a temperaturas mayores, en concreto a 75°C para los dominios C2 de la PKC α (Figura VI.12A) y de la PKC γ (Figura VI.12C), y a 70°C para el dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.12B), indicando que los dominios presentan una mayor estabilidad cuando están unidos a Ca²⁺, en especial los dominios C2 de la PKC α y de la PKC γ .

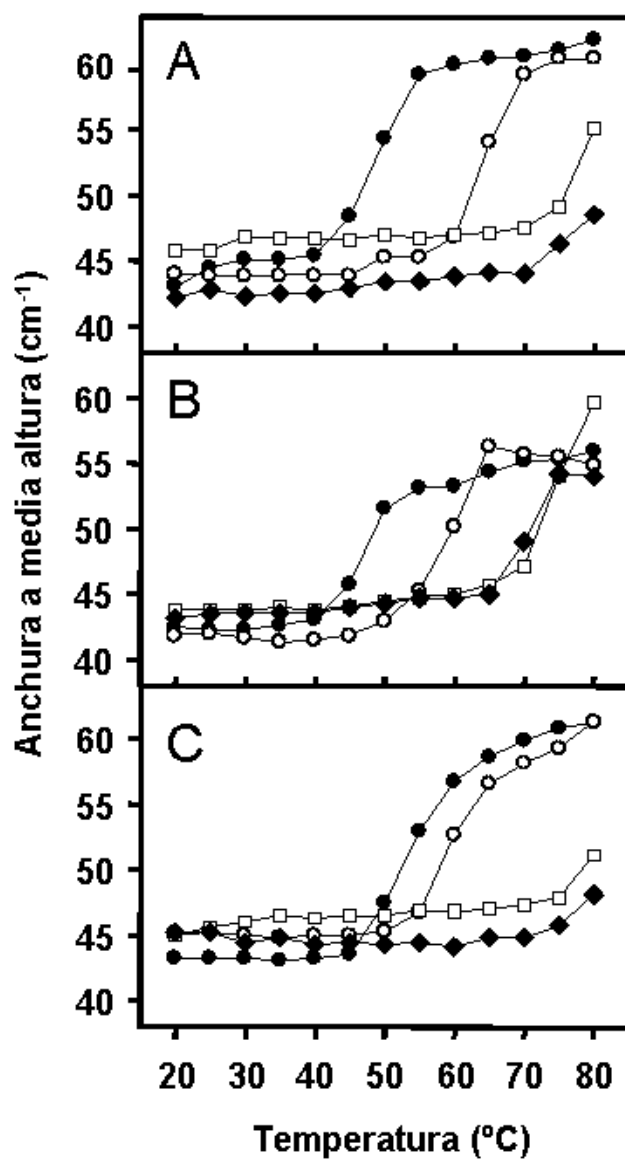


Figura VI.12. Anchura a media altura de la región amida I' de los espectros de FT-IR de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC. Se muestra la anchura de banda a media altura de la región amida I' de los dominios C2 de la PKC α (A), de la PKC β II (B) y de la PKC γ (C) en cm^{-1} en función de la temperatura en distintas condiciones: en presencia de 0,2 mM EGTA (\bullet), en presencia de Ca^{2+} 2 mM (\circ), en presencia de Ca^{2+} 12 mM (\square) y en presencia de Ca^{2+} 2 mM y SUV POPC/POPA (relación molar 1:4) (\blacklozenge).

Finalmente, en presencia de CaCl_2 2 mM y SUV POPC/POPA (relación molar 1:4), la temperatura de inicio del ensanchamiento de la banda amida I' también

aumentó, alcanzando 70°C para el dominio C2 de la PKC α (Figura VI.12A), 65°C para el dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.12B) y 75°C para el dominio C2 de la PKC γ (Figura VI.12C).

No obstante, como se comentó anteriormente, estos diferentes perfiles de desnaturalización podrían reflejar distintos movimientos del esqueleto proteico de los tres dominios, de forma que estarían más relacionados con procesos dinámicos que con cambios estructurales.

La diferente sensibilidad de los tres dominios de estas tres isoenzimas respecto a la concentración de Ca²⁺ también puede apreciarse mediante la representación tridimensional de los espectros desconvueltos de FT-IR de cada uno de ellos en presencia de distintas concentraciones de Ca²⁺ a 80°C (Figura VI.13). Así, se puede apreciar que la señal situada a 1618 cm⁻¹, que indica agregación derivada de la desnaturalización térmica, aparece en ausencia de Ca²⁺ para los tres dominios y disminuye conforme aumenta la concentración de Ca²⁺.

En el caso del dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.13B), esta señal se mantuvo presente de forma similar en todas las concentraciones de Ca²⁺ utilizadas, aunque su intensidad se redujo ligeramente.

En cambio, en el caso del dominio C2 de la PKC α , esta señal, a pesar de mantenerse presente en todas las condiciones ensayadas, redujo su intensidad de forma considerable conforme la concentración de Ca²⁺ aumentó (Figura V.13IA).

El mayor efecto se observó con el dominio C2 de la PKC γ (Figura VI.13C), donde la señal de agregación a 1618 cm⁻¹ fue reduciendo su intensidad progresivamente conforme aumentó la concentración de Ca²⁺ hasta desaparecer completamente a una relación molar ([Ca²⁺]/proteína) de 25:1.

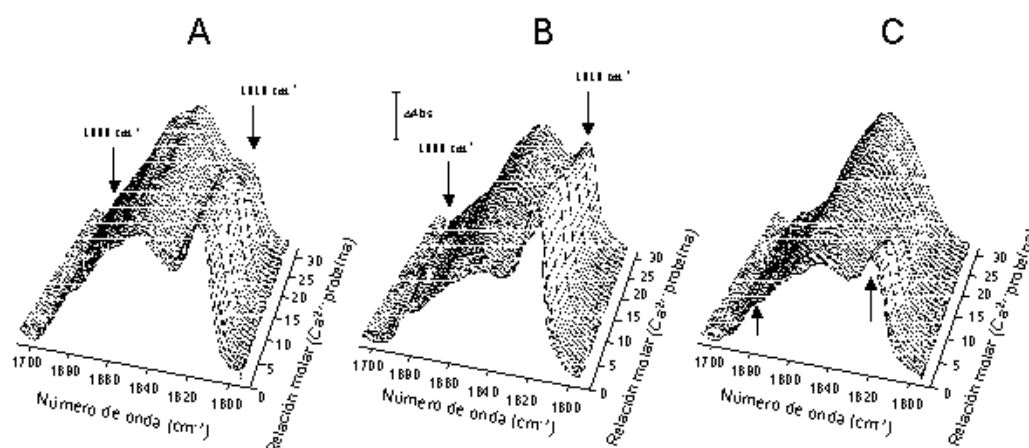


Figura VI.13. Espectros desconvueltos de FT-IR de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC a 80°C en función de la concentración de Ca^{2+} . Se muestran los espectros desconvueltos de los dominios C2 de la PKC α (A), de la PKC β II (B) y de la PKC γ (C), en sus tampones correspondientes en D_2O , en la región amida I (1700-1600 cm^{-1}) a 80°C en función de la concentración de Ca^{2+} , desde su ausencia hasta una relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$) de 30:1. Las concentraciones de Ca^{2+} se muestran en forma de relación molar ($[\text{Ca}^{2+}]/\text{proteína}$). Se destacan las señales características de la agregación a 1618 cm^{-1} y a 1680 cm^{-1} con flechas. En el caso del dominio C2 de la PKC γ , estas señales desaparecen con el aumento de la concentración de Ca^{2+} . La obtención de estos espectros desconvueltos se realizó como se comenta en el caso del análisis de la estructura secundaria (ver Figura VI.1). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue de 0,02.

3.2. Estudios de espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional.

Para profundizar en las diferencias estructurales entre los tres dominios C2 estudiados, se llevaron a cabo análisis de correlación bidimensional teniendo en cuenta los cambios producidos en función de la temperatura. Para ello se utilizó como referencia la media de los espectros obtenidos durante el barrido de temperatura.

3.2.1. Correlación bidimensional sincrona.

La Figura VI.14A muestra el mapa de contorno de la correlación sincrona del dominio C2 de la PKC α , en presencia de EGTA (ausencia de Ca^{2+}) durante el calentamiento desde 25°C hasta 80°C en intervalos de 5°C. Se observaron dos

autopicos situados a 1618 cm^{-1} y 1636 cm^{-1} que indican que las intensidades relativas espectrales de estas bandas (hoja β agregada y hoja β , respectivamente) cambiaron conforme aumentó la temperatura. A su vez, también aparecieron diversos picos cruzados. El más importante se localizó en la zona de correlación de los anteriores números de onda ($1618\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$) y fue de signo negativo, lo cual indica que durante el proceso de calentamiento los cambios registrados en la intensidad espectral de ambos números de onda fueron opuestos, es decir, que uno aumentó mientras el otro disminuyó. Este hecho puede explicarse mediante los estudios de FT-IR previos (Tabla VI.1), donde se observó la desaparición de la componente de la hoja β (1635 cm^{-1}) asociada a la aparición de la hoja β intermolecular agregada (1618 cm^{-1}).

El mapa de contorno de la correlación sincrónica del barrido de temperaturas desde 25 a 80°C del dominio C2 de la PKC β II en presencia de EGTA (Figura VI.14B) fue similar al obtenido para el dominio C2 de la PKC α . Mostró también dos autopicos, centrados en 1619 cm^{-1} y 1637 cm^{-1} , indicando de esta forma que los cambios más importantes en las intensidades espectrales ocurrían en la región de la agregación de la hoja β (1619 cm^{-1}) y en la zona correspondiente a la hoja β (1637 cm^{-1}). Además, apareció un pico cruzado negativo que correlacionó ambas regiones ($1619\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$), de forma que los cambios espectrales en ambos números de onda cambiaban en sentidos opuestos (la agregación aumentó, mientras la hoja β desapareció). Los datos previos del estudio de la estructura secundaria del dominio C2 de la PKC β II (Tabla VI.I) corroboraron estos datos.

Finalmente, el mapa de contorno del espectro de correlación sincrónico para el barrido de temperaturas desde 25 a 80°C del dominio C2 de la PKC γ en presencia de EGTA (Figura VI.14C) presentó un aspecto similar a los anteriores. Se observaron dos autopicos centrados a 1619 cm^{-1} (agregación de la hoja β) y 1637 cm^{-1} (hoja β) y sólo un pico cruzados de correlación importante, entre $1619\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$, de signo negativo como en los casos anteriores. De nuevo, los datos de FT-IR unidimensional (Tabla VI.1) corroboraron estos cambios.

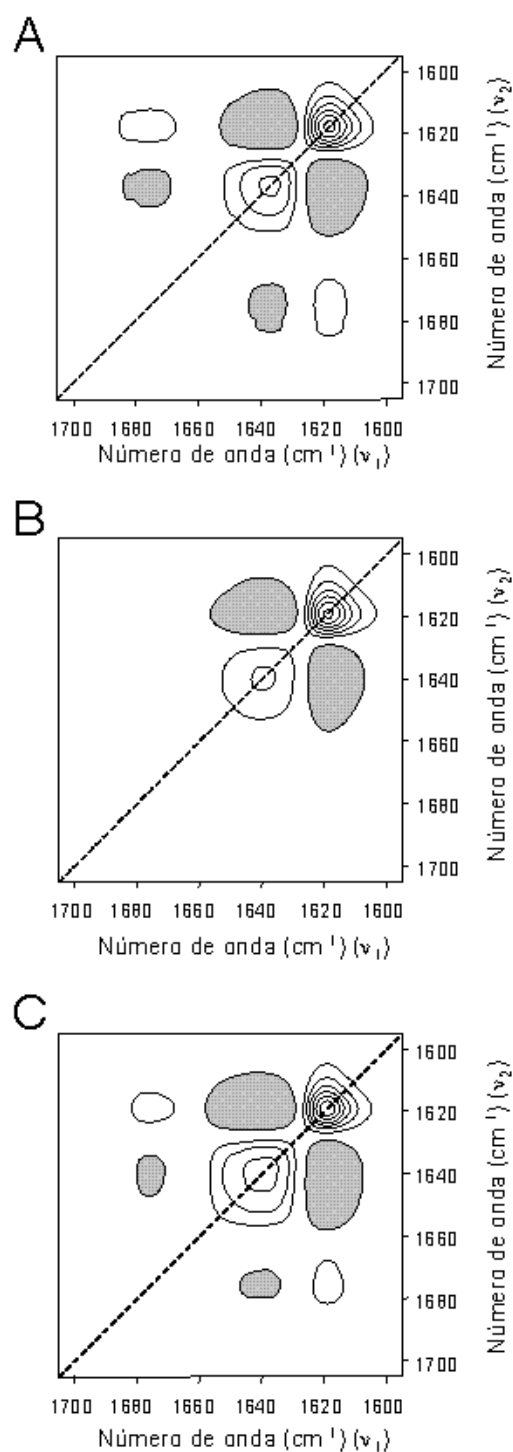


Figura VI.14. Mapa de contorno de correlación bidimensional sincrónica de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC en función de la temperatura. Se muestran los mapas de contorno de correlación bidimensional sincrónica de los dominios C2 de la PKC α (A), de la PKC β II (B) y de la PKC γ (C) entre 25 y 80°C en presencia de EGTA 0,2 mM, obtenidos utilizando el programa 2D-Pocha (Adachi y Ozaki). Los picos blancos y grises representan las correlaciones positivas y negativas, respectivamente.

3.2.2. Correlación bidimensional asincrónica.

Por otro lado, el mapa de contorno del espectro de correlación asincrónica para el barrido de temperaturas desde 25 a 80°C del dominio C2 de la PKC α en presencia de EGTA (Figura VI.15A) mostró diversas correlaciones. La más importante fue el pico cruzado de correlación entre 1616-1673 cm^{-1} . Este pico fue de signo negativo, aunque la correspondiente zona del mapa de correlación síncrona fue positiva, lo cual indica que el cambio a 1673 cm^{-1} (la desaparición de la hoja β antiparalela), ocurrió antes que el cambio a 1616 cm^{-1} (la aparición de la agregación de la hoja β). Otro pico cruzado importante se localizó entre 1616-1636 cm^{-1} , pero ya que la correspondiente zona del mapa de contorno de correlación síncrona fue negativa, el cambio a 1616 cm^{-1} (la aparición de la agregación) debió tener lugar después del cambio a 1636 cm^{-1} (la desaparición de la hoja β). Finalmente, se observó otro pico cruzado de correlación asincrónica positivo entre 1636-1673 cm^{-1} . No obstante, dado que la correspondiente zona del mapa de contorno de la correlación síncrona es negativa, en este caso el cambio a 1673 cm^{-1} (cambio en la hoja β antiparalela) ocurrió antes que el cambio a 1636 cm^{-1} (la desaparición de la hoja β).

Resulta interesante el hecho de que los mapas de contorno de la correlación asincrónica de los dominios C2 de las otras dos isoenzimas fueron relativamente similares entre sí, pero diferentes al del dominio C2 de la PKC α . Así, en el caso del mapa de contorno de la correlación asincrónica del dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.15B), se observó un "patrón de mariposa" característico de un cambio en el número de onda (Arrondo y col., 2003) que ocurriría hacia 1619 cm^{-1} , como consecuencia de la agregación que acompaña a la desnaturalización. Además se encontraron tres correlaciones principales en este mapa de contorno. La primera supuso un pico cruzado de correlación asincrónica negativo entre 1619-1630 cm^{-1} , lo cual indica que el cambio en 1630 cm^{-1} (desaparición de la hoja β) precedió al cambio en 1619 cm^{-1} (aparición de la agregación de la hoja β), pues la correspondiente región del mapa de contorno de correlación síncrona fue positiva.

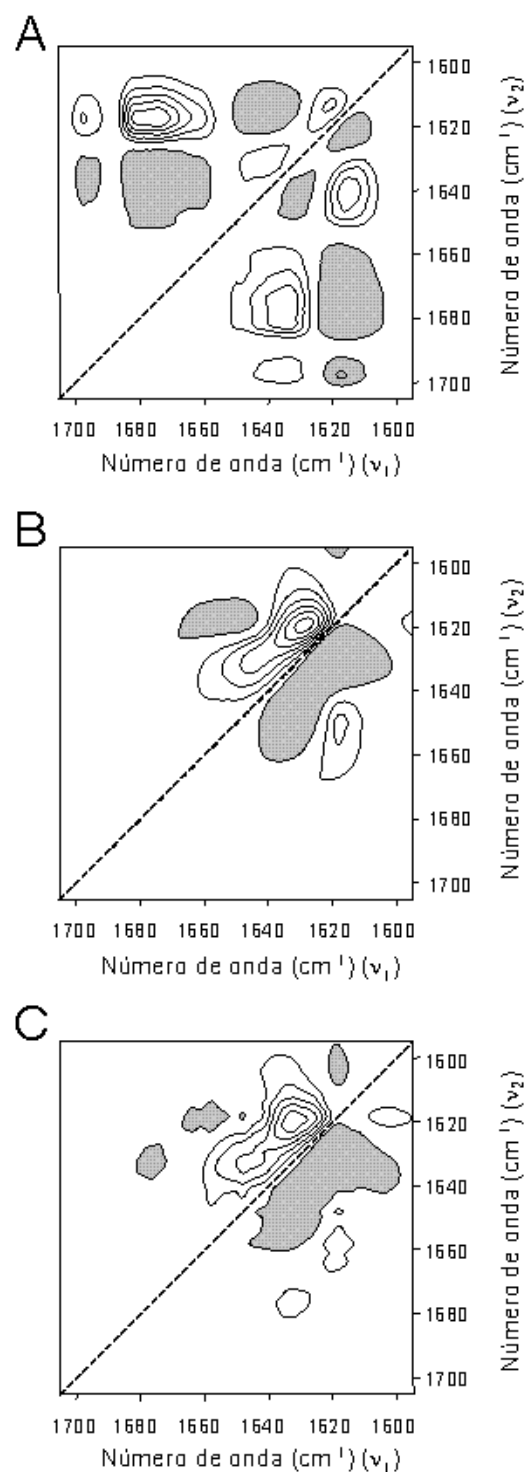


Figura VI.15. Mapa de contorno de correlación bidimensional asincrónica de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC en función de la temperatura. Se muestran los mapas de contorno de correlación bidimensional asincrónica de los dominios C2 de la PKCα (A), de la PKCβII (B) y de la PKCγ (C) entre 25 y 80°C en presencia de EGTA 0,2 mM, obtenidos utilizando el programa 2D-Pocha (Adachi y Ozaki). Los picos blancos y grises representan las correlaciones positivas y negativas, respectivamente.

Apareció otro pico cruzado de correlación asíncrona negativo entre 1630-1643 cm^{-1} , que indica que el cambio a 1643 cm^{-1} (aumento de la estructura desordenada y giros abiertos) ocurrió primero, pues la correspondiente región del mapa de contorno de correlación síncrona fue positiva. Finalmente, se observó un pico cruzado de correlación asíncrona de signo positivo entre 1617-1650 cm^{-1} , pero dado que la correspondiente región del mapa de contorno de correlación síncrona fue negativa, esto indicó que el cambio a 1650 cm^{-1} (desaparición de la hélice α) precede al cambio en 1617 cm^{-1} (aparición de la agregación de la hoja β).

El análisis asíncrono del barrido de temperatura entre 25 y 80°C del dominio C2 de la PKC γ en ausencia de ligandos mostró un comportamiento similar al del dominio C2 de la PKC β II (Figura VI.15C). El mapa de contorno de la correlación asíncrona se caracterizó por presentar el “patrón de mariposa” como en el caso anterior, hacia 1619 cm^{-1} , con tres picos cruzados relevantes. El primero apareció entre 1619-1633 cm^{-1} y fue negativo, como en el caso anterior, y dado que la región correspondiente del mapa de correlación síncrona fue negativa, este pico cruzado indica que el cambio a 1633 cm^{-1} (la desaparición de la hoja β) ocurrió antes que el cambio a 1619 cm^{-1} (la agregación de la misma). Un nuevo pico cruzado asíncrono negativo apareció entre 1634-1647 cm^{-1} , y como la región correspondiente del mapa de correlación síncrona fue positiva, esto quiere decir que el cambio en 1647 cm^{-1} (la aparición de la estructura desordenada) ocurrió primero, como en el caso del dominio C2 de la PKC β II. Finalmente, un nuevo pico cruzado asíncrono negativo se encontró entre 1635-1657 cm^{-1} , sugiriendo que los cambios en la hélice α (1657 cm^{-1}) precedieron a los de la hoja β (1635 cm^{-1}).

La gran diferencia entre el mapa asíncrono del dominio C2 de la PKC α y los de los dominios C2 de la PKC β II y de la PKC γ es que en el primero no se observa claramente el “patrón de mariposa”, a pesar de que hay ciertos indicios de su existencia (aparecen unas correlaciones negativas en esa zona). Esto puede deberse a la separación temporal entre la desaparición de la hoja β intermolecular y la agregación de la hoja β (pico cruzado a 1616-1673 cm^{-1}), la cual estaría claramente definida en el caso del dominio C2 de la PKC α , como se puede observar en la representación tridimensional de los espectros desconvueltos durante el calentamiento en ausencia de ligandos (Figura VI.3). En el caso del dominio C2 de la

PKC α , la desaparición de la hoja β intermolecular (1673 cm^{-1}) ocurrió claramente antes que el inicio de la agregación a $1616\text{-}1619\text{ cm}^{-1}$. En cambio, para los dominios C2 de la PKC β II y de la PKC γ , estos sucesos ocurrieron casi simultáneamente, por lo que el cambio en el número de onda caracterizado por el “patrón de mariposa” quedaría resaltado.

4. DISCUSIÓN.

Las distintas sensibilidades que muestran los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC α , PKC β II y PKC γ por Ca^{2+} y lípido, así como el distinto comportamiento durante el desplegamiento térmico, ponen de manifiesto que, aunque las secuencias de aminoácidos e incluso las estructuras tridimensionales de los mismos son muy similares en principio (ver Capítulo IV de esta misma Memoria), existen diferencias entre ellas que pueden ser significativas a la hora de intentar explicar sus conocidas especializaciones funcionales.

Las estructuras secundarias de los tres dominios C2 son similares, tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} a 25°C . Estas estructuras son similares a las estructuras tridimensionales obtenidas mediante difracción de rayos-X con los dominios C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999) y de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998) (Tabla VI.5), lo cual indica que la espectroscopía de infrarrojo proporciona una buena aproximación de las cantidades relativas de las distintas estructuras secundarias de una proteína. No obstante, algunas diferencias en la estructura secundaria surgen mediante FT-IR cuando el Ca^{2+} se estudia como agente protector frente a la desnaturalización térmica, de forma que el dominio C2 de la PKC γ es quien presenta un mayor efecto protector, mientras que el dominio C2 de la PKC β II es quien menor protección experimenta, necesitando así una concentración de Ca^{2+} considerablemente mayor para evitar la aparición de la hoja β intermolecular, hecho que es conocido como señal de desnaturalización.

Las diferencias observadas durante los procesos de desnaturalización pueden reflejar diversos movimientos del esqueleto de las proteínas, por lo que podría tener una mayor relación con procesos dinámicos que con cambios estructurales (Careaga

y Falke, 1992; Butler y Falke, 1996). Este hecho se puede analizar mediante diferentes técnicas como el intercambio H-D (Volkman y col., 1998; Idiyatullin y col., 2003) o el tratamiento de los grupos disulfuro (Careaga y Falke, 1992; Butler y Falke, 1996), a pesar de que la espectroscopía de infrarrojo también puede proporcionar cierta información acerca de esto. Cabe destacar este hecho pues el presente estudio proporciona información sobre la estabilidad y dinámica de estas proteínas, lo cual no se había detectado mediante estudios estructurales anteriores, como con la difracción de rayos-X que da una visión estática de la estructura de las proteínas. Por ello, esto supone un gran interés a la hora de analizar y entender las diferencias funcionales entre ellas. Esto puede significar que el Ca^{2+} al unirse al dominio C2 proporciona propiedades específicas a cada dominio, que podría explicar los efectos diferenciales tanto a nivel intramolecular como intermolecular en el caso de cada isoenzima.

Tabla VI.5. Comparación de la estructura de los dominios C2 obtenida mediante distintas técnicas.

	Dominio C2 PKC α		Dominio C2 PKC β	
	3D ^a	FT IR ^b	3D ^c	FT IR ^d
Hoja- β	54	59	58	57
Hélice- α	10	12	10	14
Giros- β	21	18	17	17
Desordenada	15	11	14	12

^aVerdaguer y col., 1999. ^bNuestros resultados con el dominio C2 de la PKC α en presencia de Ca^{2+} 12 mM a 25°C. ^cSutton y Sprang, 1998. ^dNuestros resultados con el dominio C2 de la PKC β II en presencia de Ca^{2+} 12 mM a 25°C.

La presencia de fosfolípido junto con Ca^{2+} produjo algunos cambios en la estructura secundaria de los dominios C2 de las tres isoenzimas, principalmente con un descenso en la proporción de hoja β y un aumento del porcentaje de estructura desordenada y hélice α , como si la presencia de fosfolípido pudiera influir en la estructura secundaria de estos dominios. En presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos, el

dominio C2 de la PKC γ experimentó una mayor protección frente a la desnaturalización térmica que los dominios C2 de las isoenzimas α y β II. De hecho, la estructura secundaria del dominio C2 de la PKC γ apenas varió entre la temperatura de 25°C y 80°C.

La utilización de la espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional proporcionó mayores detalles sobre los mecanismos de desplegamiento que sufren los dominios C2 durante la desnaturalización térmica, poniendo de manifiesto ciertas diferencias entre ellos. Así, por ejemplo, la correlación sincrónica de la desnaturalización térmica de los tres dominios en ausencia de Ca²⁺ puso de manifiesto que los cambios más importantes ocurrieron en la región de 1616-1619 cm⁻¹, lo cual se corresponde con un aumento de la agregación de la hoja β en la proteína desnaturalizada. Este cambio estaba correlacionado principalmente con la hoja β para los tres dominios C2.

Por otro lado, la correlación asíncrona de la desnaturalización térmica de los tres dominios en ausencia de Ca²⁺ mostró en todos los casos que la agregación de la hoja β aumentó después de los cambios en otros componentes estructurales y que los cambios en los giros β (en el caso de la isoenzima α y γ), en la hélice α y en los giros (en el caso de la isoenzima γ) y en la estructura desordenada y giros abiertos (en el caso de la isoenzima β II y γ) ocurren antes, es decir a temperaturas más bajas, que los cambios en la hoja β . Este hecho puede entenderse fácilmente analizando la estructura de los dominios C2, donde el núcleo principal de la proteína es el sándwich β , el cual permanecería más resistente frente a la desnaturalización térmica que las restantes estructuras periféricas. No obstante, es interesante el hecho de que existen ciertas diferencias entre los tres dominios, como se indica mediante las distintas correlaciones observadas en cada caso. A juzgar de las correlaciones sincrónica y asíncrona, parece ser que el dominio C2 de la isoenzima α difiere sustancialmente de los otros dos, pues no se observa el “patrón de mariposa” tan claramente como en los otros casos, a pesar de que existen indicios de su presencia. Lo que parece ser más importante en el caso del dominio C2 de la PKC α es la separación temporal entre la desaparición de la hoja β intermolecular y la agregación de la hoja β , mientras que posiblemente en los otros dos casos no existiría tal

separación y los cambios en el número de onda serían los más representativos del proceso.

La especialización de las diferentes isoenzimas clásicas de la PKC puede apreciarse a través de sus diferentes papeles, por ejemplo, en relación al cáncer. La sobreexpresión de la PKC α lleva a un fenotipo más agresivo de tumor (Ways y col., 1995) y un compuesto antisentido dirigido al codón de inicio de la traducción AUG de la PKC α murina inhibe el crecimiento de tumores en ratones desnudos (Yazaki y col., 1996; Dean y col., 1996). Por otro lado, se ha descrito que niveles de expresión elevados de la PKC β I llevan a la inhibición del crecimiento de células HT29 de cáncer de colon y la supresión de tumores (Goldstein y col., 1995; Choi y col., 1990). La PKC β I también produce pérdida de la dependencia de anclaje, limita el crecimiento a altas densidades celulares y provoca la formación de tumores en fibroblastos de rata R6 en ratones desnudos (Borner y col., 1995). También bloquea la diferenciación celular y estimula la proliferación (Sauma y col., 1996; Khuri y col., 1996). Por su parte, la PKC β II puede utilizarse como marcador de ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de colon. Se ha observado que el nivel de PKC β II aumenta dramáticamente en la proliferación de colonias (Murray y col., 1999) y que se transloca *in vitro* al núcleo de células HL60 humanas (células de leucemia de promielocitos humanos) (Hocevar y Fields, 199; Neri y col., 2002). Además, la PKC α juega un papel importante en los contactos celulares (Llosas y col., 1996) y en la supresión de la apoptosis (Romanova y col., 1996). Los niveles de la PKC β II se elevan en células vasculares expuestas a altos niveles glucosa y parece estar involucrada en la disfunción vascular inducida por la diabetes (Inoguchi y col., 1992) y en la retinopatía diabética (Frank, 2002). La sobreexpresión de la PKC β II está implicada también en el fallo cardíaco y en complicaciones cardiovasculares (Dean y col., 1996; Cornford y col., 1999; Bowling y col., 1999; Wakasaki y col., 1997). Por otro lado, la PKC γ se expresa solamente en el sistema nervioso central (Nishizuka, 1988; Bell y Burns, 1991) y está implicada en el desarrollo del dolor persistente inducido por heridas (Basbaum, 1999; Martin y col., 2001). Se ha descrito que una mutación en la PKC γ de rata provoca un síndrome Parkinsoniano (Craig y col., 2001). También se ha propuesto que la PKC γ juega un papel en el control de las uniones tipo gap de la lente cortical (Saleh y col., 2001). Se han obtenido ratones transgénicos tipo “knockout” para la PKC γ (Abeliovich y col., 1993) y la PKC β

(Leitges y col., 1996), los cuales están asociados a desórdenes neurológicos y del sistema inmune, respectivamente.

Las diferencias encontradas en este trabajo entre los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC sugieren que estas proteínas tienen distintas capacidades de adaptar sus estructuras tridimensionales durante la interacción con ligandos, como el Ca^{2+} o los fosfolípidos, los cuales tienen un papel clave en la activación de la PKC. Así, mientras la PKC γ es sensible a pequeños aumentos en la concentración de Ca^{2+} , mayores concentraciones son necesarias para afectar la estructura del dominio C2 de la isoenzima β II. El anclaje a la membrana de la proteína completa dependería principalmente de la capacidad del Ca^{2+} de actuar como puente entre el dominio C2 y los fosfolípidos aniónicos de la membrana (Verdaguer y col., 1999). Así, sería interesante detectar las diferentes sensibilidades de los dominios C2 en cuanto a la unión de Ca^{2+} ya que esto supondría una indicación de las diferencias en las capacidades de anclaje a la membrana. En este sentido, es interesante el hecho de que las sensibilidades observadas en este trabajo son muy similares a las descritas en un trabajo anterior (Kohout y col., 2002), donde se comentó que un incremento pequeño en la concentración de Ca^{2+} permitiría el anclaje a la membrana de la PKC γ de forma más eficiente que la PKC α , la cual a su vez lo haría de manera más eficiente que la isoenzima β . Además, la introducción del uso de una técnica relativamente nueva, como es la correlación bidimensional de la espectroscopía de infrarrojo, demostrando su utilidad para analizar interacciones complejas entre proteínas y ligandos.

Estas diferencias pueden ser significativas para las especializaciones funcionales de las isoenzimas clásicas de la PKC. Hasta la aportación de nueva información acerca del papel concreto de cada una de las distintas isoenzimas clásicas de la PKC a nivel celular, la contribución de este trabajo puede ser útil para intentar entender mejor la relación entre su estructura y su función.

Capítulo VII

Estructura secundaria de la PKC α e interacción con diferentes ligandos.

1. RESUMEN.

Se estudió la estructura secundaria de la PKC α purificada mediante FT-IR. En ausencia de ligandos y a 20°C, la PKC α mostró como componente principal la hoja β , con el 44% del total, mientras que la hélice α supuso el 22%. Además se utilizaron distintos ligandos (como Ca $^{2+}$, PMA, ATP y fosfolípidos aniónicos) para estudiar los efectos que producen sobre la estructura secundaria de la PKC α , así como sobre su estabilidad frente a la desnaturalización térmica. La presencia de los distintos ligandos provocó cambios en la estructura secundaria de la proteína a 20°C, siendo los más importantes los observados en presencia de Ca $^{2+}$, donde la hoja β plegada aumentó hasta el 48%. Los mayores cambios se observaron en el estudio del calentamiento de la proteína hasta 75°C en presencia de los ligandos. Esto afectó al proceso de desplegamiento de la proteína, de forma que la PKC α mostró una mayor protección frente a la desnaturalización térmica en presencia de Ca $^{2+}$, con el descenso de la hoja β agregada, situada a 1618 cm $^{-1}$, desde el 19% en ausencia de ligandos hasta el 13%. También se observó este efecto en presencia de PMA o de fosfolípidos aniónicos.

Además, se analizó el proceso de desnaturalización de la PKC α mediante 2D-IR, tanto en ausencia como en presencia de los ligandos. El análisis sincrónico mostró en todos los casos que los principales cambios tuvieron lugar a 1616-1619 cm $^{-1}$, lo cual se corresponde con el incremento en la hoja β agregada intermolecular de la forma desnaturalizada de la proteína. Este cambio estuvo relacionado en todos los casos con 1654-1657 cm $^{-1}$, correspondiente a la hélice α , con la excepción de la muestra con una combinación de ligandos (Ca $^{2+}$, ATP, PMA y fosfolípidos aniónicos) donde la hoja β agregada mostró correlación con el cambio de la componente de la hoja β a 1635 cm $^{-1}$. Por otro lado, el análisis asincrónico mostró las diferencias existentes en el orden secuencial de acontecimientos que ocurren durante el proceso de desnaturalización térmica en presencia de los distintos ligandos. Así, la agregación de la hoja β aumentó tras los cambios en las restantes componentes estructurales, siendo interesante el hecho de que los cambios en la hélice α ocurrieron antes que los de la hoja β en todos los casos, salvo en el caso de la presencia de PMA, donde el orden secuencial fue el contrario, siendo la hoja β la que cambió antes que la hélice α .

2. INTRODUCCIÓN.

La proteína quinasa C consta de una sola cadena polipeptídica donde se pueden diferenciar una región reguladora en el extremo amino terminal, con un tamaño entre 20 y 40 kDa, y una región catalítica en el extremo carboxilo terminal, con un tamaño aproximado de 45 kDa (Coussens y col., 1986). En la estructura de la PKC se pueden distinguir cuatro dominios conservados (llamados C1-C4) y cinco regiones variables (V1-V5) (Coussens y col., 1986). La función de estos dominios conservados se ha caracterizado mediante mutagénesis y estudios bioquímicos. De esta forma, la región reguladora contiene el dominio C1, el cual constituye el sitio de unión a DAG/ésteres de forbol (Bell y Burns, 1991), y el dominio C2, que posee el sitio de reconocimiento de fosfolípidos aniónicos y, en algunas isoenzimas, el sitio de unión a Ca^{2+} (Newton, 1995). Por otro lado, la región catalítica contiene el dominio C3, que incluye el sitio de enlace de ATP, y el dominio C4, que posee el sitio de unión del sustrato (Taylor y Radzio-Andzelm, 1994).

Hasta la fecha se han identificado diez isoenzimas de la PKC en mamíferos clasificadas en tres grandes subfamilias en función de su estructura primaria y de la regulación de su actividad catalítica mediante cofactores (Nishizuka, 1995; Newton, 1995; Mellor y Parker, 1998; Newton y Johnson, 1998; Toker, 1998; Newton, 2001). La subfamilia de las isoenzimas clásicas es la mejor conocida y los integrantes de este grupo se activan mediante su traslocación a la membrana en un proceso regulado por dos tipos de señales moleculares: el Ca^{2+} y el DAG.

La estructura tridimensional de alta resolución de la PKC completa aún no se ha resuelto, a pesar de que sí se ha conseguido determinar las estructuras tridimensionales de distintos dominios de la misma. De esta forma, destacan los estudios sobre la estructura del dominio C1 de la PKC δ (Zhang y col., 1995), de la PKC α (Hommel y col., 1994) y de la PKC γ (Xu y col., 1997), que se caracterizan por la presencia de una secuencia rica en Cys (dedos de zinc) que adopta una estructura globular con dos hojas β antiparalelas, de tres y dos cadenas respectivamente, y una pequeña hélice α en el extremo carboxilo terminal. Este

dominio uno ésteres de forbol sin variación de la estructura (Zhang y col., 1995). Por otro lado, son numerosos los trabajos publicados sobre la estructura tridimensional de alta resolución del dominio C2 de la PKC β I (Sutton y Sprang, 1998), de la PKC δ (Pappa y col., 1998), de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002) y de la PKC ϵ (Ochoa y col., 2001). La estructura de este dominio consiste en ocho cadenas β antiparalelas agrupadas en dos hojas de cuatro cadenas cada una que forman un sándwich β compacto. Este dominio interacciona con la membrana para la activación de la proteína a través de un puente de Ca^{2+} , establecido gracias a la presencia de un sitio de alta afinidad por Ca^{2+} rico en residuos Asp (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). En el caso del dominio C2 de la PKC α se ha propuesto la existencia de una zona de interacción con fosfolípidos adicional e independiente de Ca^{2+} , en una región rica en Lys (Ochoa y col., 2002), la cual puede servir para la activación de la PKC α por PIP_2 (Corbalán-García y col., 2003). Finalmente, a pesar de que la resolución de la estructura tridimensional de la región catalítica no se conoce todavía, se ha propuesto un modelo para la PKC β II (Orr y Newton, 1994), basándose en la estructura tridimensional de la región catalítica de la PKA (Knighton y col., 1991), dada la elevada homología de secuencia entre ambas. La estructura propuesta supone la existencia de una cavidad correspondiente al sitio activo que estaría bloqueada por el pseudosustrato en el estado inactivo de la proteína (Orr y Newton, 1994).

Los estudios con la proteína completa son escasos y hasta la fecha ha sido imposible obtener cristales de buena calidad para la difracción de rayos-X. No obstante, se han llevado a cabo algunos estudios de la estructura de la PKC de baja resolución con microcristales de la PKC β donde se estimó el tamaño y la forma de la proteína (Solodukhin y col., 2002), o bien algunos estudios de la estructura de cristales bidimensionales de la PKC δ purificada (Solodukhin y col., 2002). Además se han llevado a cabo otros estudios de baja resolución de la estructura de la PKC mediante dicroísmo circular (Shah y Shipley, 1992; Boscá y Morán, 1993), aunque en estos casos se utilizaron muestras aisladas a partir de tejidos biológicos que contenían mezclas de diversas isoenzimas.

En este trabajo se ha utilizado la PKC α clonada en baculovirus y expresada y purificada a partir de células de insecto para llevar a cabo el estudio de la estructura secundaria de la enzimas mediante FT-IR. Además, se analizó el desplegamiento térmico de la proteína y el efecto producido por la presencia de diferentes ligandos que actúan como activadores de la enzima. Finalmente, se utilizó 2D-IR para intentar aclarar el orden de acontecimientos durante la desnaturalización térmica, así como para intentar analizar el tipo de interacción con los distintos ligandos. De esta manera, queda patente la enorme importancia de la utilización de esta técnica relativamente nueva, a la hora de estudiar la estructura de proteínas.

3. RESULTADOS.

3.1. Estudios de la estructura secundaria mediante FT-IR.

3.1.1. Estructura secundaria de la PKC α a 20°C.

Se estudió la estructura secundaria de la PKC α mediante la espectroscopía de infrarrojo. La descomposición de la banda amida I' de la forma nativa de la PKC α en tampón con agua deuterada y EGTA 200 μ M (ausencia de ligandos) a 20°C se muestra en la Figura VII.1A.

Inicialmente, tanto el número como la posición de las bandas componentes se obtuvieron a partir de la segunda derivada y la desconvolución de los espectros obtenidos. Los parámetros (posición, porcentaje del área total y correspondencia o asignación con la estructura) de las bandas componentes se muestran en la Tabla VII.I. El espectro de la PKC α en presencia de 200 μ M EGTA a 20°C se puede descomponer en siete bandas en la región amida I' (1700-1600 cm^{-1}). La contribución cuantitativa de cada componente se calculó mediante el ajuste de la curva del espectro original utilizando el programa Grams/32 (Galactic Industries Corp., Salem, NH, E.E.U.U.).

La componente principal de la región amida I' está situada a 1631 cm^{-1} y proviene de las vibraciones intramoleculares de los grupos C=O de las hojas β (Krimm y Bandekar, 1986; Susi y Byler, 1987; Arrondo y col., 1989; Fabian y col., 1992; Arrondo y col., 1994b; Gonzalez y col., 1997; Zhang y col., 1998). La componente de alta frecuencia localizada a 1676 cm^{-1} se puede atribuir a la estructura de hoja β antiparalela (Arrondo y col., 1989; Muga y col., 1993). La componente situada a 1657 cm^{-1} corresponde a la hélice α (Krimm y Bandekar, 1986; Bandekar, 1992; Arrondo y col., 1994b). La banda que aparece a 1644 cm^{-1} puede asignarse a conformaciones de estructura desordenada (Susi y col., 1967; Fabian y col., 1992). Las bandas localizadas a 1669 cm^{-1} y 1690 cm^{-1} provienen de los giros β (Arrondo y col., 1989; Muga y col., 1993). Finalmente, se observa una banda adicional situada alrededor de 1610 cm^{-1} que se atribuye a la absorción de las cadenas laterales de los aminoácidos (Susi y col., 1967; Bandekar, 1992; Cladera y col., 1992) y, por lo tanto, su contribución no ha sido incluida en el cálculo de la estructura secundaria de la PKC α .

El procedimiento utilizado en estos experimentos para calcular cuantitativamente la estructura secundaria de la PKC α presenta típicamente un error de aproximadamente 1% (Arrondo y col., 1994a). No obstante, en nuestro caso, mediante la comparación de los ajustes de, al menos, tres experimentos independientes y la repetición del proceso realizado por tres personas diferentes, se concluyó que el error experimental fue aproximadamente 1-2%, de forma que se consideraron como significativos los cambios estructurales mayores a 4%.

La estructura secundaria de la PKC α en presencia de EGTA $200\text{ }\mu\text{M}$ a 20°C se muestra en la Tabla VIII y se caracteriza por un alto porcentaje de hoja β , ya que teniendo en cuenta las aportaciones de las componentes a 1631 cm^{-1} y a 1676 cm^{-1} , este tipo de estructura presenta una contribución del 49%. La hélice α (1657 cm^{-1}) alcanza un 22% de la estructura total, al igual que la estructura desordenada (1644 cm^{-1}). Finalmente, los giros β suponen el 7% de la estructura global, tomando en conjunto las componentes a 1669 cm^{-1} y a 1690 cm^{-1} .

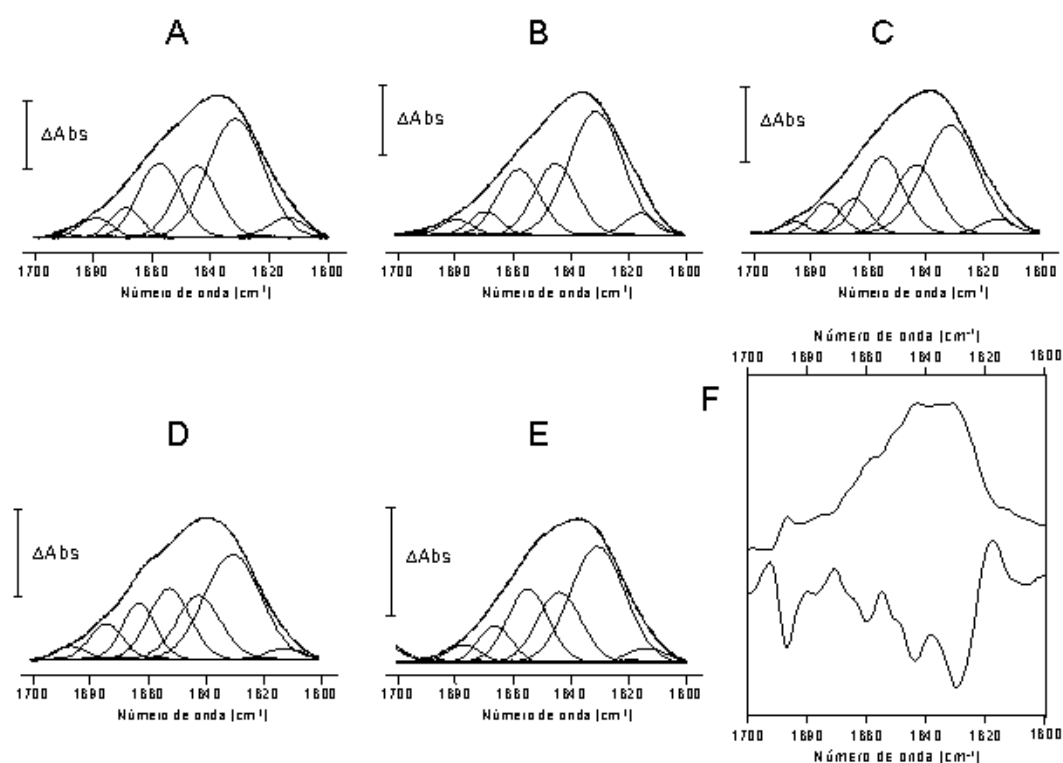


Figura VII.1. Espectros de FT-IR de la PKC α a 20°C. Se muestran los espectros de FT-IR de la PKC α en la región amida I' (1600-1700 cm^{-1}) a 20°C en tampón deuterado con las bandas componentes ajustadas. Este tampón contenía Tris-HCl 25 mM pD 7,5 y NaCl 200 mM. Se analizaron diferentes muestras: la presencia de EGTA 200 μM (A), Ca^{2+} 600 μM (B), ATP 500 μM con ZnCl_2 1 μM (C), PMA 500 μM con ZnCl_2 1 μM (D) y una combinación de Ca^{2+} 250 μM , ATP 500 μM , PMA 500 μM y POPC/POPA 56,4 mM (relación molar, 1:4) en presencia de ZnCl_2 1 μM (E). La proteína se incubó a 4°C durante toda la noche para maximizar el intercambio H-D. La concentración de la proteína fue aproximadamente 5 mg/ml (60 μM). El incremento de las unidades de Abs (ΔAbs) fue 0,04. Los espectros de infrarrojo se recogieron en un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Bruker modelo Vector 22 equipado con un detector MCT. La cámara del espectrofotómetro se purgó continuamente con aire seco para evitar que el vapor de agua de la atmósfera interfiriese con las bandas de interés. Las muestras se examinaron en una célula termostaticada Specac 20710 (Specac, Kent, Inglaterra), equipada con ventanas de CaF_2 y espaciadores de teflón de 25 μm . Cada espectro se obtuvo mediante la acumulación de 128 barridos con una resolución nominal de 2 cm^{-1} y a continuación se llevó a cabo la transformada de Fourier utilizando una función de apodización triangular. El número, la posición, la anchura y la intensidad de cada componente individual se estimaron inicialmente mediante la desconvolución y la derivación del espectro original utilizando el programa Grans/32. La desconvolución de Fourier de la muestra en presencia de EGTA (espectro superior en F) se realizó utilizando una función de suavizado tipo Bessel, con forma Lorentziana, con un factor γ 10 y una anchura a media altura de 20 cm^{-1} . La derivada de Savitzki-Golay de la misma muestra (espectro inferior en F) de segundo grado se calculó con 7-13 cm^{-1} de suavizado. Para el resto de muestras se utilizó el mismo procesamiento. Después se realizó el ajuste de la curva y los valores de la altura, las anchuras y posiciones de cada banda se fueron optimizando sucesivamente hasta llegar al ajuste final. Las áreas fraccionarias de las componentes de la región amida I' se calcularon a partir de las áreas de las bandas ajustadas. Los parámetros correspondientes a estas componentes aparecen reflejados en la Tabla VII.1. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original.

Tabla VII.1. Parámetros de FT-IR de las bandas componentes de la PKC α en la región amida I a 20°C. Se utilizaron tampones D₂O en presencia de EGTA 200 μ M (A), Ca²⁺ 600 μ M (B), ATP 500 μ M con ZnCl₂ 1 μ M (C), PMA 500 μ M con ZnCl₂ 1 μ M (D) y la combinación de Ca²⁺ 250 μ M, ATP 500 μ M, PMA 500 μ M y POPC/POPA 56,4 mM (40mg/ml) (relación molar, 1:4) en presencia de ZnCl₂ 1 μ M (E).

Asignación	A		B		C		D		E	
	Posición ^a (cm ⁻¹)	Área ^b (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)
Gros β	1690	1	1690	1	1686	2	1685	2	1689	1
Hoja β antiparalela	1676	5	1677	4	1674	8	1674	7	1677	4
Gros β	1669	6	1669	5	1663	12	1664	7	1666	9
Hélice- α	1657	22	1657	20	1652	19	1655	22	1655	21
Estructura desordenada	1644	22	1644	22	1642	19	1643	20	1644	21
Hoja β	1631	44	1631	48	1630	40	1631	42	1631	44

^aPosiciones de los picos de las bandas componentes de la región amida I' de la PKC α a 20°C.

^bPorcentaje de las bandas componentes de la región amida I'. El área correspondiente a las cadenas laterales localizadas a 1600-1615 cm⁻¹ no se consideró.

Se obtuvieron resultados muy similares (Figura VII.1 y Tabla VII.I) en la estructura secundaria de la proteína en presencia de los distintos ligandos utilizados. Tanto en presencia de PMA (Figura VII.1C y Tabla VII.I) como en presencia de una combinación de ligandos con fosfolípidos aniónicos (Ca²⁺, ATP, PMA y una mezcla de POPC/POPA a una relación molar 1:4) (Figura VII.1E y Tabla VII.I), las diferencias en la estructura secundaria de la PKC α respecto a la comentada anteriormente en ausencia de ligandos, se situaron en torno a un 1-2% para cada componente, los cuales no se consideraron significativos. En cambio, en presencia de otros ligandos como Ca²⁺ (Figura VII.1B y Tabla VII.I) y ATP (Figura VII.1D y Tabla VII.I), las diferencias en la estructura secundaria resultaron mayores. Así, en presencia de Ca²⁺ 600 μ M (Figura VII.1B y Tabla VII.I), lo cual supuso una relación molar ([Ca²⁺]/proteína) de aproximadamente 1:10, la estructura secundaria de la PKC α muestra un importante aumento en la hoja β (1631 cm⁻¹), la cual asciende un 4% hasta 48%, en detrimento de pequeños descensos repartidos entre el resto de componentes.

Por otro lado, en presencia de ATP 500 μ M con ZnCl₂ 1 μ M (Figura VII.1D y Tabla VII.I) se observaron dos cambios importantes. En primer lugar, se detectó un

gran aumento en los giros β (1663 cm^{-1}), llegando hasta un 12% respecto al 6% en ausencia de ligandos. En segundo lugar, la hoja β (1631 cm^{-1}) sufrió un descenso hasta el 40% respecto al 44% en ausencia de ligandos.

3.1.2. Estructura secundaria de la PKC α a 75°C.

Con el fin de intentar dilucidar los posibles cambios estructurales que ocurren durante la unión de ligandos a la proteína se realizaron diferentes estudios sobre la estabilidad térmica de la proteína tanto en ausencia como en presencia de ligandos.

El análisis de la estructura secundaria de la PKC α en D₂O y en ausencia de ligandos a 75°C, mostró los cambios principales que tienen lugar en la banda amida I' (Figura VII.2A). Estos cambios consistieron en el ensanchamiento global del contorno de la banda amida I' y en la aparición de las dos componentes correspondientes a la agregación de la hoja β , localizadas a 1618 cm^{-1} y 1679 cm^{-1} y características de las proteínas desnaturalizadas térmicamente (Arrondo y col., 1989; Cladera y col., 1992). Estas componentes indican que las estructuras extendidas se formaron por la agregación de la proteína desnaturalizada como consecuencia de la desnaturalización térmica irreversible (Susi, 1972; Surewicz y col., 1990; Arrondo y col., 1994a) y supusieron un 19% y un 8% de la estructura secundaria total, respectivamente (Tabla VII.2). No obstante, además de la aparición de estas componentes, se observaron otros cambios en la estructura como resultado de la desnaturalización térmica. Así, la componente principal del espectro de la PKC α en ausencia de ligandos a 75°C (Figura VII.2A) se encontró a 1643 cm^{-1} , supuso el 33% del área total de la banda amida I' y se asignó a la estructura desordenada. La banda correspondiente a la hoja β mostró dos cambios principales: su contribución se redujo hasta un 20% y el número de onda máximo de esta componente cambió desde 1631 cm^{-1} a 20°C hasta 1629 cm^{-1} a 75°C (Tablas VII.1 y VII.2). Por otro lado, la hélice α sufrió una reducción desde el 22% a 20°C hasta el 12% a 75°C (Tablas VII.1 y VII.2). De esta forma, la desnaturalización térmica de la PKC α está caracterizada por una agregación irreversible y un desplegamiento de la estructura de la hoja β hasta una estructura desordenada con un importante descenso de la hélice α .

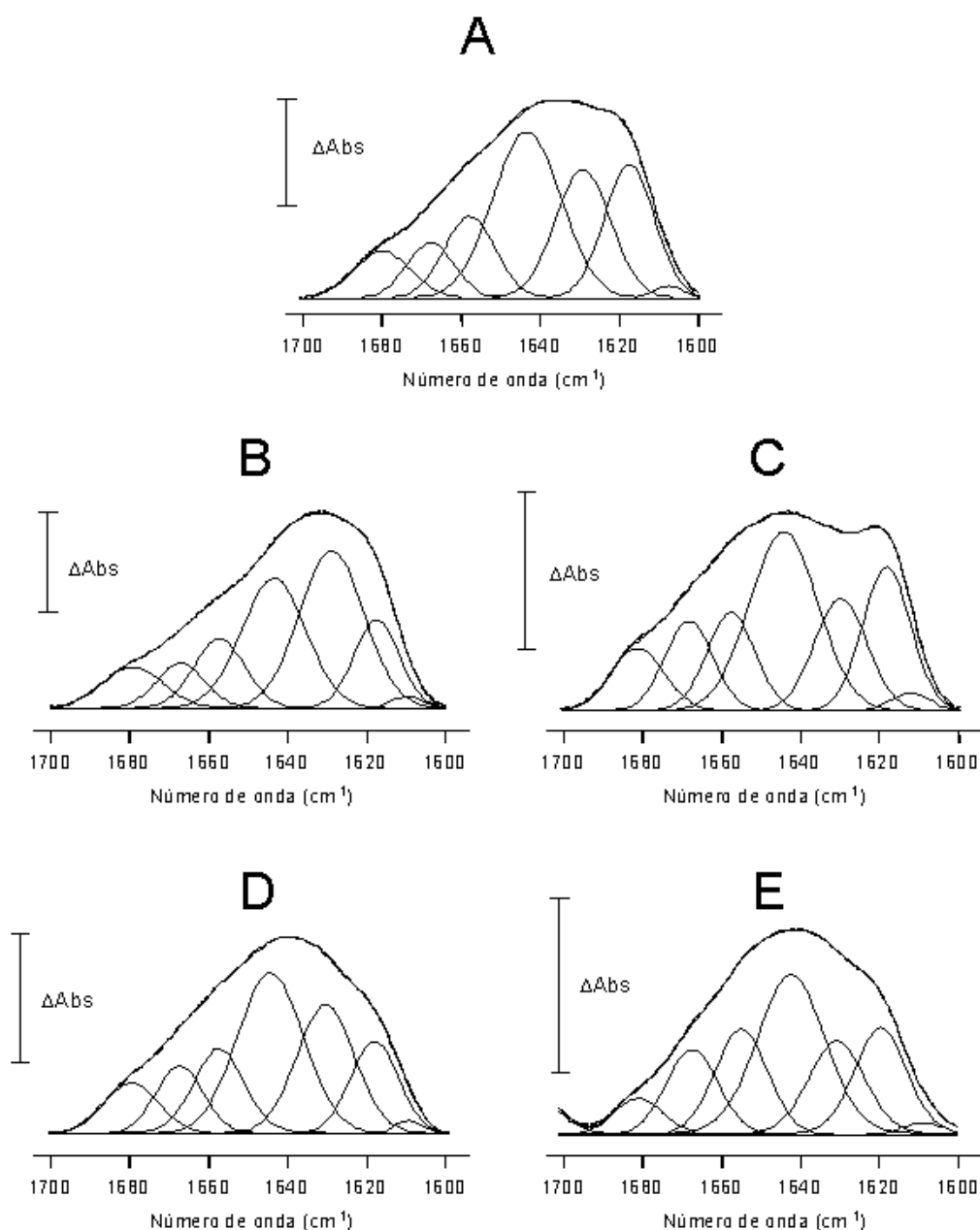


Figura VII.2. Espectros de FT-IR de la PKC α en tampón deuterado a 75°C. Se muestran los espectros de FT-IR de la PKC α en tampón deuterado, en la región amida I' (1600-1700 cm^{-1}) a 75°C con las bandas componentes ajustadas. Las muestras analizadas fueron la presencia de EGTA 200 μM (A), Ca^{2+} 600 μM (B), ATP 500 μM con ZnCl_2 1 μM (C), PMA 500 μM con ZnCl_2 1 μM (D) y una combinación de Ca^{2+} 250 μM , ATP 500 μM , PMA 500 μM y POPC/POPA 56,4 mM (relación molar, 1:4) en presencia de ZnCl_2 1 μM (E). El procedimiento para la obtención de los espectros y su procesamiento para llevar a cabo el ajuste de las bandas componentes fue el mismo que en el caso anterior (ver Figura VII.1). La concentración de la proteína fue 5 mg/ml (60 μM). El incremento de las unidades de Abs (ΔAbs) fue 0,04. Los parámetros correspondientes a las bandas componentes de la región amida I' aparecen reflejados en la Tabla VI.1. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original. Se utilizó el programa Grams/32 para el tratamiento de los espectros de la misma manera que se comentó en la Figura VII.1.

Tabla VII.2. Parámetros de FT-IR de las bandas componentes de la PKC α en la región amida I a 75°C. Se utilizaron tampones D₂O en presencia de EGTA 200 μ M (A), Ca²⁺ 600 μ M (B), ATP 500 μ M con ZnCl₂ 1 μ M (C), PMA 500 μ M con ZnCl₂ 1 μ M (D) y la combinación de Ca²⁺ 250 μ M, ATP 500 μ M, PMA 500 μ M y POPC/POPA 56,4 mM (40mg/ml) (relación molar, 1:4) en presencia de ZnCl₂ 1 μ M (E).

Asignación	A		B		C		D		E	
	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)	Posición (cm ⁻¹)	Área (%)
Hoja β agregada	1679	8	1679	8	1681	9	1679	8	1680	5
Giros β	1667	8	1667	7	1667	11	1667	10	1667	13
Hélice α	1657	12	1657	12	1657	12	1657	12	1654	16
Estructura desordenada	1643	33	1644	27	1644	33	1644	32	1642	33
Hoja β	1629	20	1629	33	1630	16	1631	23	1630	17
Hoja β agregada	1618	19	1618	13	1618	19	1618	15	1619	16

La adición de Ca²⁺ 600 μ M (Figura VII.2B y Tabla VII.2), lo cual supone una relación molar ([Ca²⁺]/proteína) 10:1, dio lugar a cierta protección sobre la proteína, de forma que la hoja β descendió sólo hasta el 33% a 75°C y la componente de agregación de la hoja β (señal a 1618 cm⁻¹) sólo aumentó hasta un 13%. La estructura desordenada sólo aumentó hasta un 27%, frente al 33% en ausencia de ligandos. Por otro lado, la hélice α descendió hasta un 12%, nivel similar al alcanzado por la PKC α en ausencia de ligandos (Figura VII.2A y Tabla VII.2).

La presencia de PMA 500 μ M y ZnCl₂ 1 μ M (Figura VII.2C y Tabla VII.2) también proporcionó cierta protección frente a la desnaturalización térmica aunque fue menos importante que en el caso del Ca²⁺. Así, la componente a 1618 cm⁻¹, que se corresponde con la agregación de la hoja β , sólo llegó hasta un 15% a 75°C en presencia de PMA, cuando en ausencia de ligandos alcanzó el 19%. En este caso, la hoja β situada a 1631 cm⁻¹ se redujo hasta el 23%.

Otro de los ligandos analizados fue ATP 500 μ M en presencia de ZnCl₂ 1 μ M (Figura VII.2D y Tabla VII.2). Este compuesto también introdujo algunos cambios en el patrón de desnaturalización de la proteína, dando lugar a un mayor descenso de la hoja β , la cual supuso tan solo un 16%, en comparación con el 19% en ausencia de ligandos, y a un aumento de los giros β hasta un 11%.

Finalmente, la muestra donde se combinaron distintos ligandos con fosfolípidos aniónicos (Ca^{2+} 250 μM , ATP 500 μM , PMA 500 μM y POPC/POPA 56,4 mM a una relación molar 1:4, en presencia de ZnCl_2 1 μM) (Figura VII.2E y Tabla VII.2) también produjo algunas alteraciones en el patrón de desnaturalización, de forma que se observó un descenso en las componentes características de la agregación de la hoja β , a 1619 cm^{-1} y a 1680 cm^{-1} , que contribuyeron al área total de la banda amida I' con un 16% y un 5%, respectivamente. Esto supone que la estructura agregada en conjunto alcanzó el 21% del área total, mientras que en ausencia de ligandos llegó hasta un 27%. Cabe destacar también que la componente de la hélice α (1654 cm^{-1}) descendió tan solo hasta el 16% (12% en ausencia de ligandos). Asimismo, se observó un aumento en los giros β (a 1667 cm^{-1}) que alcanzaron un 13% de la estructura secundaria total.

Es interesante destacar el hecho de que la PKC α se encontraba unida a la mezcla de ligandos con fosfolípidos aniónicos utilizada en los experimentos de FT-IR de forma importante, como se pudo apreciar a través de un ensayo de unión. En este experimento se utilizaron vesículas unilamelares grandes de POPC/POPA a una relación molar 1:4, cargadas de sacarosa (Figura VII.3). La relación molar (proteína/fosfolípidos) fue la misma que la utilizada en los experimentos de FT-IR. La PKC α unida a las vesículas o la libre se detectó mediante inmunoanálisis de forma similar a la descrita en anteriores trabajos (Torrecillas y col., 2002; Conesa-Zamora y col., 2002) (Figura VII.3A). La cantidad de proteína unida o libre se cuantificó mediante densitometría. Se utilizaron distintas concentraciones de Ca^{2+} y se observó que incluso en presencia de las menores cantidades de Ca^{2+} , la PKC α se encontraba unida a las vesículas en una proporción similar (aproximadamente al 60%) (Figura VII.3B).

3.1.3. Estudio de la desnaturalización térmica de la PKC α .

La Figura VII.4 muestra la representación de la variación de la anchura a media altura de la banda amida I' en función de la temperatura, lo cual supone una medida válida para detectar la desnaturalización térmica (Arrondo y col., 1994a). De

esta manera, se puede observar que el efecto de los distintos ligandos sobre la estabilización térmica de la PKC α no fue exactamente el mismo. Así, mientras el Ca²⁺ y el PMA protegieron claramente a la proteína del ensanchamiento de la banda amida I' inducido por la temperatura, otros ligandos como el ATP o la combinación de Ca²⁺, ATP, PMA y fosfolípidos aniónicos no mostraron este efecto, a pesar de que modifican de alguna manera el patrón de desnaturalización de la proteína.

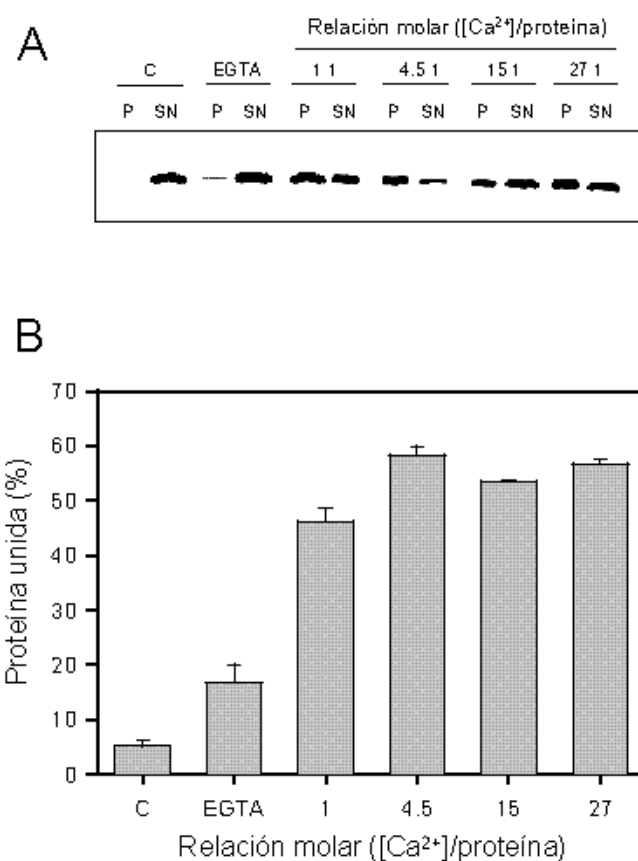


Figura VII.3. Unión de la PKC α a membranas con POPC/POPA. Se utilizaron 50 μ g de la PKC α y 400 μ g de LUVs cargadas de sacarosa compuestas de POPC/POPA (relación molar, 1:4) para reproducir las condiciones utilizadas en los experimentos de FT-IR. Las LUVs se prepararon mediante extrusión como se describió en el Capítulo II de esta Memoria. Básicamente, los lípidos se resuspendieron en Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, sacarosa 250 mM y DTT 1 mM mediante agitación energética. Las vesículas se congelaron y descongelaron a 30°C cinco veces y, a continuación, se pasaron a través de dos filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 0,1 μ m utilizando un aparato Extruder (Lipex Biomembranes Inc., Canada). El volumen final de cada muestra fue de 200 μ l y los experimentos se llevaron a cabo a 20°C. Tras incubar la proteína con las mezclas lipídicas durante 20 minutos, se sometieron a ultracentrifugación a 100.000 \times g durante 60 minutos a 15°C. Se ensayaron distintas concentraciones de Ca²⁺ y controles sin proteína (denominado C) y sin el ión (llamado EGTA). La proteína unida a las vesículas o libre se detectó mediante ensayos de inmunanálisis (A). La cuantificación de la proteína se realizó mediante densitometría y se dibujó en un diagrama de barras (B).

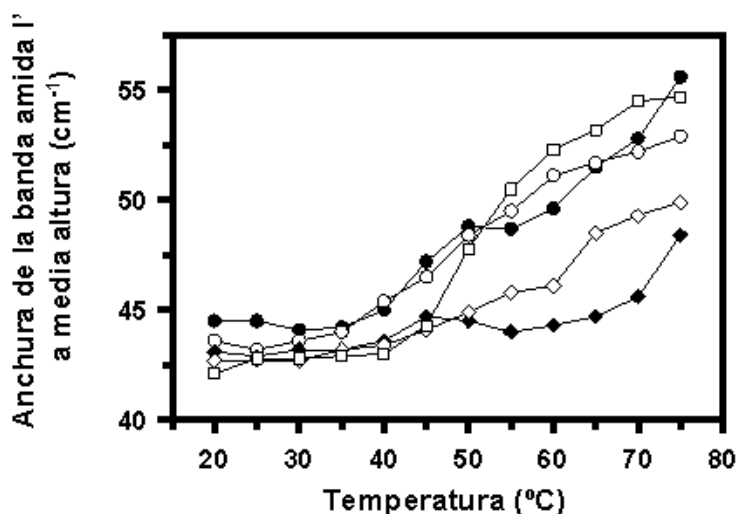


Figura VII.4. Anchura a media altura de la región amida I' de la PKC α en función de la temperatura. Se representa la variación de la anchura a media altura (en cm^{-1}) de los espectros de FT-IR de la PKC α desde 20°C a 75°C, en presencia de EGTA 200 μM (●), Ca^{2+} 600 μM (▲), ATP 500 μM con ZnCl_2 1 μM (△), PMA 500 μM con ZnCl_2 1 μM (○) y Ca^{2+} 250 μM , ATP 500 μM , PMA 500 μM y POPC/POPA 56,4 mM (40 mg/ml) (relación molar, 1:4) (○).

Con el fin de observar mejor los cambios que tienen lugar durante la desnaturalización térmica, se representaron tridimensionalmente los espectros desconvueltos de la PKC α en ausencia y en presencia de los distintos ligandos durante el proceso de calentamiento, de 20°C a 75°C (Figura VII.5).

En ausencia de ligandos, el ensanchamiento de la banda amida I' y a la aparición de las componentes características de la agregación a 1618 cm^{-1} y 1679 cm^{-1} , puede observarse claramente a partir de esta representación tridimensional (Figura VII.5A). Comparando esta representación con las obtenidas de los barridos en presencia de Ca^{2+} (Figura VII.5B) o PMA (Figura VII.5D), se puede comprobar claramente que tanto el ensanchamiento general del contorno de la banda amida I', como la señal a 1618 cm^{-1} , indicativa de la agregación, se han reducido. En presencia de ATP (Figura VII.5C) o de la combinación de ligandos con fosfolípidos (Figura VII.5E) se pudieron apreciar los efectos característicos de la agregación, como en el caso de ausencia de ligandos.

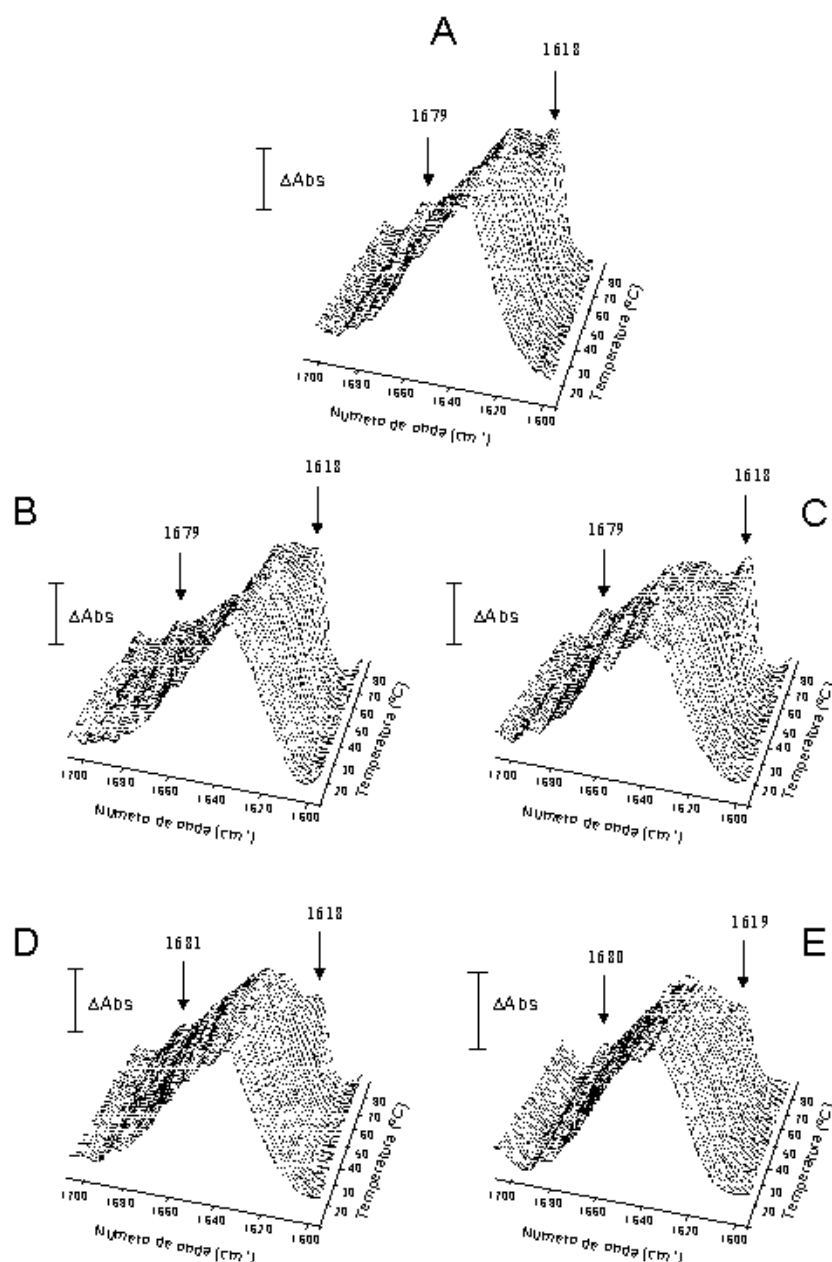


Figura VII.5. Espectros desconvueltos de FT-IR de la PKC α en función de la temperatura. Se muestran los espectros desconvueltos de la PKC α en tampón deuterado en la región amida I $^{\prime}$ (1600-1700 cm^{-1}) en función de la temperatura entre 20 y 75°C. Las muestras fueron en presencia de EGTA 200 μM (A), Ca^{2+} 600 μM (B), ATP 500 μM con ZnCl_2 1 μM (C), PMA 500 μM con ZnCl_2 1 μM (D) y Ca^{2+} 250 μM , ATP 500 μM , PMA 500 μM y POPC/POPA 56,4 mM (40 mg/ml) (relación molar, 1:4) en presencia de ZnCl_2 1 μM (E). La concentración de la proteína fue aproximadamente de 5 mg/ml (60 μM). La obtención de estos espectros desconvueltos se realizó como se comenta en el caso del análisis de la estructura secundaria (ver Figura VII.1). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue de 0,04. Se destacan las posiciones de las componentes características de la agregación, localizadas a 1618-1619 cm^{-1} y a 1679-1681 cm^{-1} .

Este comportamiento tan variado en cuanto a los perfiles de desnaturalización de la PKC α en presencia de los distintos ligandos podría reflejar diferentes movimientos en el esqueleto de la proteína, estando así más relacionado con procesos dinámicos que con cambios estructurales, como se comentó en el Capítulo VI de esta misma Memoria.

3.2. Estudios de espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional.

Se obtuvo una mayor profundización en el mecanismo de desplegamiento de la proteína y en el papel de los distintos ligandos a través de la espectroscopía de correlación bidimensional. En todos los casos se utilizó como espectro referencia para la correlación el espectro medio de los barridos de temperatura entre 20 y 75°C.

3.2.1. Correlación bidimensional sincrónica.

El mapa de contorno de la correlación sincrónica del proceso de desnaturalización térmica de la PKC α en ausencia de ligandos (Figura VII.6A) mostró la presencia de dos autopicos centrados a 1617 cm^{-1} y 1650 cm^{-1} , lo cual indica que los principales cambios que tuvieron lugar durante el desplegamiento de la proteína inducido por efecto de la temperatura tienen que ver con la agregación de la hoja β (1617 cm^{-1}) y la hélice α (1650 cm^{-1}). El pico cruzado más intenso apareció localizado entre ambos números de onda (1617-1650 cm^{-1}) y fue negativo, lo cual indica que durante el proceso de calentamiento una de las componentes aumenta (la agregación de la hoja β a 1617 cm^{-1}), mientras que la otra disminuye (la hélice α a 1650 cm^{-1}). Estas conclusiones se pueden explicar mediante los estudios de FT-IR anteriormente descritos, donde se observó la desaparición de la componente de la hélice α asociada a la aparición de la agregación de la hoja β intermolecular (Figura VII.1 y VII.2 y Tablas VII.1 y VII.2).

La presencia de Ca $^{2+}$ (Figura VII.6B), ATP (Figura VII.6C) o PMA (Figura VII.6D) no modificaron sensiblemente el mapa de contorno de la correlación sincrónica del proceso de desnaturalización de la PKC α en ausencia de ligandos comentado anteriormente, de forma que se observaron los mismos picos de correlación (autopicos y picos cruzados).

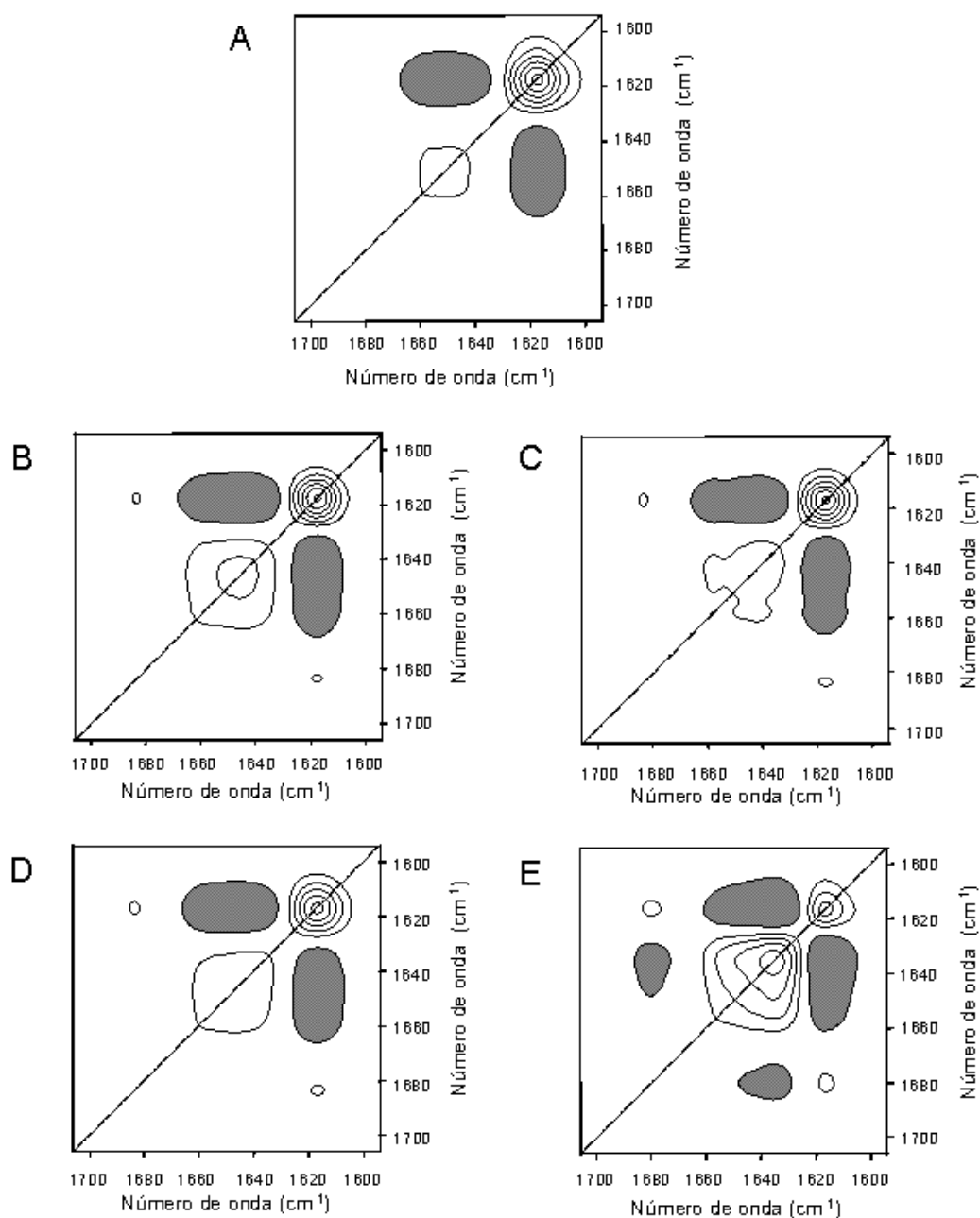


Figura VII.6. Mapas de contorno de la correlación bidimensional sincrónica de los espectros de la PKC α en función de la temperatura. Se utilizaron los espectros entre 20°C y 75°C en presencia de EGTA 200 μ M (A), Ca $^{2+}$ 600 μ M (B), ATP 500 μ M con ZnCl $_2$ 1 μ M (C), PMA 500 μ M con ZnCl $_2$ 1 μ M (D) y la combinación de Ca $^{2+}$ 250 μ M, ATP 500 μ M, PMA 500 μ M y POPC/POPA 56,4 mM (40 mg/ml) (relación molar, 1:4) en presencia de ZnCl $_2$ 1 μ M (E). La correlación se calculó utilizando el programa 2D-Pocha (Adachi y Ozaki). Los picos blancos y grises indican las correlaciones positivas y negativas respectivamente.

En cambio, la adición de la combinación de ligandos con los fosfolípidos aniónicos (Ca^{2+} 250 μM , ATP 500 μM , PMA 500 μM y POPC/POPA 56,4 mM a una relación molar 1:4, en presencia de ZnCl_2 1 μM) (Figura VII.6E) produjo un cambio importante en el mapa de contorno de la correlación síncrona. Así, en este caso los autopicos aparecieron situados a 1616 cm^{-1} y 1635 cm^{-1} , lo cual indica que los principales cambios durante el proceso de desnaturalización térmica de la PKC α en presencia de estos compuestos tuvieron lugar en la hoja β agregada (1616 cm^{-1}) y en la hoja β plegada (1635 cm^{-1}). En este caso, además, se observó la presencia de varios picos de correlación cruzados. El más importante se localizó en 1616-1636 cm^{-1} y fue negativo, indicando que la agregación de la hoja β (1616 cm^{-1}) cambió en sentido opuesto a la hoja β (1636 cm^{-1}). Según los estudios de FT-IR anteriores, la hoja β disminuye mientras la agregación de la misma aumenta.

3.2.2. Correlación bidimensional asíncrona.

El mapa de contorno de la correlación asíncrona de la PKC α en presencia de EGTA durante el proceso de calentamiento entre 20°C y 75°C (Figura VII.7A) mostró un “patrón de mariposa” característico de un desplazamiento de la frecuencia en los espectros (Arrondo y col., 2003), el cual tendría lugar hacia 1617 cm^{-1} como consecuencia de la agregación asociada a la desnaturalización.

El máximo de esta correlación de “tipo mariposa” de signo negativo se encontró a 1617-1629 cm^{-1} , lo cual indica que el cambio a 1629 cm^{-1} (descenso de la hoja β) precedió al cambio a 1617 cm^{-1} (la aparición de la agregación de la hoja β intermolecular). La cola de esta zona de correlación presenta dos picos de correlación de signo negativo a 1634-1649 cm^{-1} y a 1634-1658 cm^{-1} , lo cual indica que los cambios en la hoja β (1634 cm^{-1}) ocurrieron después de los cambios en las componentes de la estructura desordenada (1649 cm^{-1}) y de la hélice α (1658 cm^{-1}). Finalmente, se observó otro pico de correlación de signo positivo a 1618-1658 cm^{-1} , el cual indica que los cambios en la hélice α (desaparición) ocurrieron antes que los cambios en la agregación de la hoja β intermolecular (aumento), ya que la correspondiente zona del mapa de contorno de la correlación síncrona fue de signo negativo.

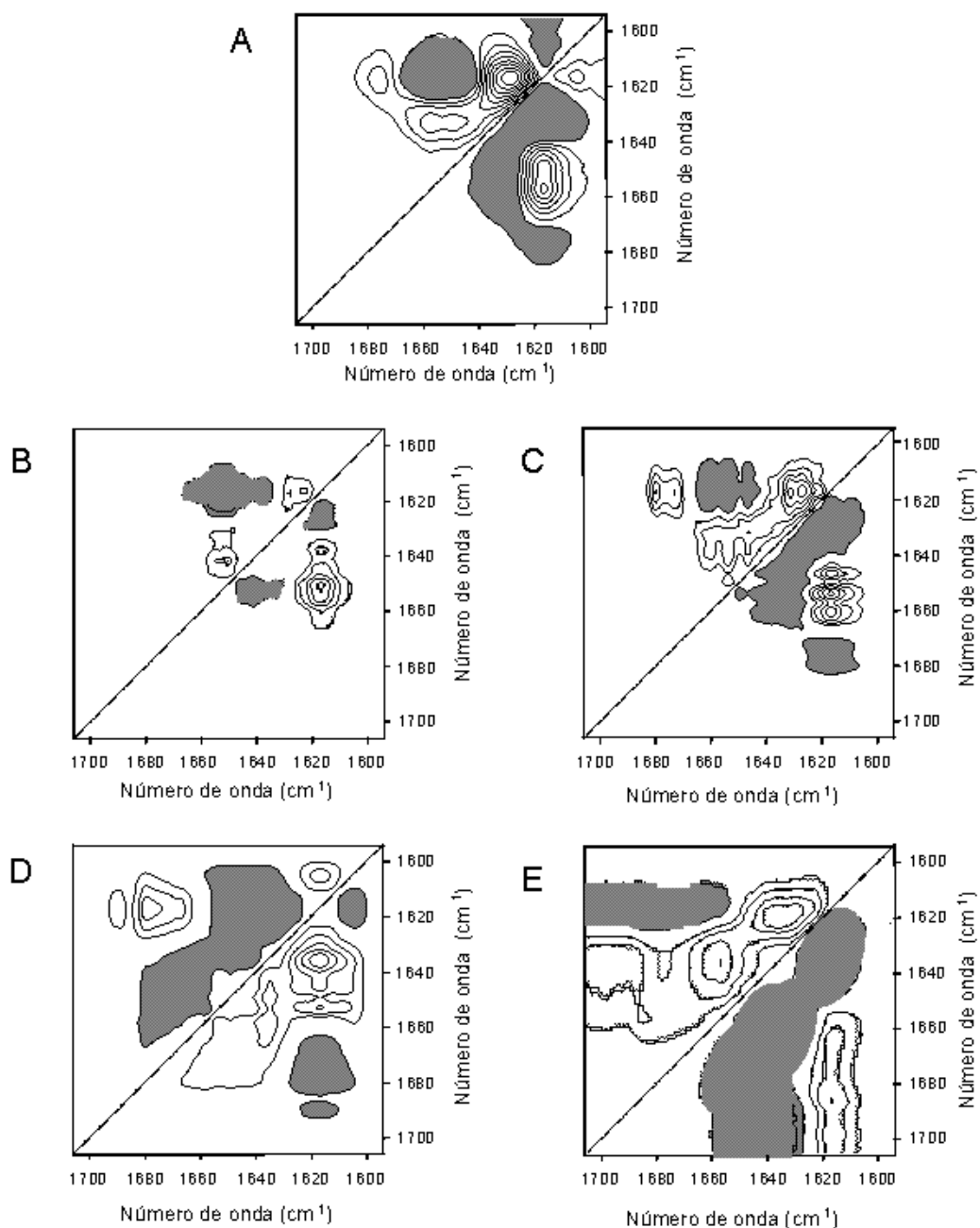


Figura VII.7. Mapas de contorno de la correlación bidimensional asíncrona de los espectros de la PKC α en función de la temperatura. Se utilizaron los espectros entre 20°C y 75°C en presencia de EGTA 200 μ M (A), Ca $^{2+}$ 600 μ M (B), ATP 500 μ M con ZnCl $_2$ 1 μ M (C), PMA 500 μ M con ZnCl $_2$ 1 μ M (D) y la combinación de Ca $^{2+}$ 250 μ M, ATP 500 μ M, PMA 500 μ M y POPC/POPA 56,4 mM (40 mg/ml) (relación molar, 1:4) en presencia de ZnCl $_2$ 1 μ M (E). La correlación se calculó utilizando el programa 2D-Pocha (Adachi y Ozaki). Los picos blancos y grises indican las correlaciones positivas y negativas respectivamente.

El análisis asíncrono del barrido de temperaturas de la PKC α en la presencia de Ca²⁺ 600 μ M, lo cual supone una relación molar ([Ca²⁺]/proteína) de 1:10, mostró un aspecto bastante diferente (Figura VII.7B), con un solo pico de correlación significativo a 1617-1651 cm⁻¹. El signo de esta correlación fue positivo pero, ya que la correspondiente zona del espectro de correlación síncrona era negativa, se deriva que el cambio en la hélice α (1651 cm⁻¹) ocurrió antes que la aparición de la hoja β agregada (1617 cm⁻¹). Este pico de correlación es similar a uno de los observados en presencia de EGTA (Figura VII.7A), a pesar de que ahora, en presencia de Ca²⁺, no se detecta el “patrón de mariposa” correspondiente al desplazamiento espectral en frecuencias, como era de esperar a partir del papel protector del Ca²⁺.

El mapa de contorno de la correlación asíncrona de la muestra en presencia de ATP 500 μ M con ZnCl₂ 1 μ M (Figura VII.7C) fue muy similar al obtenido con la muestra control con EGTA (Figura VII.7A), mostrando aproximadamente las mismas correlaciones.

En presencia de PMA 500 μ M con ZnCl₂ 1 μ M (Figura VII.7D) se observó un cambio en el mapa de contorno de la correlación asíncrona aparentemente significativo respecto a la muestra con EGTA. A pesar de que en este caso también se detectó cierto “patrón de mariposa” hacia 1617 cm⁻¹, el signo de la correlación fue ahora positivo en lugar de negativo. De cualquier manera, el significado final de esta correlación resultó ser el mismo. Esto se debe a que el pico máximo de correlación en esta zona se encontró a 1617-1636 cm⁻¹, asociando los cambios en la hoja β agregada (1617 cm⁻¹) con los de la hoja β (1636 cm⁻¹). El área correspondiente del espectro de correlación síncrona (Figura VII.6D) fue, en este caso, negativa, de forma que el descenso de la hoja β (1636 cm⁻¹) ocurrió antes que la agregación de la hoja β intermolecular (1617 cm⁻¹). Así, el orden secuencial de estos acontecimientos fue el mismo que en el caso de la muestra control con EGTA. Parece ser que el autopico localizado a 1617 cm⁻¹ en el mapa de contorno síncrono de la muestra con EGTA (Figura VII.6A) presentó un mayor diámetro, cubriendo así una mayor región y afectando al pico cruzado de correlación a 1617-1629 cm⁻¹ en el espectro asíncrono de la muestra control con EGTA (Figura VII.7A). En el caso de la muestra con PMA,

el autopico a 1617 cm^{-1} de la correlación sincrónica (Figura VII.6D) no fue tan grande y el pico cruzado a $1617\text{-}1636\text{ cm}^{-1}$ en el mapa de contorno asíncrono no está bajo la influencia de este autopico, sino del pico cruzado de correlación sincrónica negativo localizado a $1617\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$. De cualquier manera, el mapa de contorno de la correlación asíncrona de la muestra con PMA (Figura VII.7D) mostró que existe una diferencia importante en el orden secuencial de los sucesos que ocurren durante la desnaturalización térmica, como se deduce del pico de correlación situado a $1636\text{-}1658\text{ cm}^{-1}$. Como este pico es positivo, así como la región correspondiente del mapa de correlación sincrónica, el orden secuencial en este caso sugiere que los cambios en la hoja β (1636 cm^{-1}) tienen lugar antes que los de la hélice α (1658 cm^{-1}), justo al contrario de como ocurre en el caso de la muestra control con EGTA.

Finalmente, el mapa de contorno de la correlación asíncrona de la muestra en presencia de la combinación de ligandos con Ca^{2+} $250\text{ }\mu\text{M}$, ATP $500\text{ }\mu\text{M}$, PMA $500\text{ }\mu\text{M}$ y POPC/POPA $56,4\text{ mM}$ a una relación molar 1:4, en presencia de ZnCl_2 $1\text{ }\mu\text{M}$ (Figura VII.7E) fue muy similar al obtenido en presencia de EGTA (Figura VII.7A), mostrando aproximadamente las mismas correlaciones. Las únicas diferencias se encontraron en la región cercana a 1700 cm^{-1} debido probablemente al efecto producido la presencia de fosfolípido que absorbe por encima de dicha frecuencia.

4. DISCUSIÓN.

La determinación de la estructura de la PKC α con alta resolución no se ha obtenido aún, por lo que resulta útil realizar una estimación de dicha estructura aunque sea con baja resolución. Con este objetivo se ha utilizado una técnica muy adecuada para el cálculo de la estructura secundaria de las proteínas, como es la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR). La estructura secundaria descrita en este trabajo mediante FT-IR supone la primera estimación de la estructura completa de una PKC purificada, en este caso la PKC α . Algunos estudios previos sobre la estructura de la PKC se llevaron a cabo utilizando otras

técnicas, como el dicroísmo circular (Shah y Shipley, 1992; Boscá y Morán, 1993), aunque en estos casos se usaron muestras extraídas de distintos tejidos biológicos, formados por mezclas de diferentes isoenzimas de la PKC. Por ello, los resultados obtenidos con la PKC α purificada no pueden ser comparados de forma absoluta con los trabajos previamente publicados sobre la estructura de la PKC.

En la Tabla VII.3 se muestra un resumen de los distintos resultados obtenidos anteriormente sobre la estructura de la PKC para poder realizar una comparación con nuestros resultados de FT-IR. Además se incluye también una estimación aproximada de la estructura secundaria de la PKC calculada a partir de las estructuras tridimensionales de alta resolución obtenidas de forma independiente de los diferentes dominios de la proteína, como el pseudosustrato (Nishikawa y col., 1997), el dominio C1 de la PKC α (Hommel y col., 1994; Ichikawa y col., 1995) y el dominio C2 de la PKC α (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). A pesar de que la estructura del dominio catalítico no se conoce todavía, se ha utilizado para esta estimación la estructura de la PKC el dominio catalítico de la proteína quinasa A (PKA) (Knighton y col., 1991), teniendo en cuenta la elevada homología de secuencia existente entre estos dominios (Orr y Newton, 1994). Tomando estos datos de los distintos dominios de la proteína podemos realizar una aproximación de la estructura de la PKC α sobre 437 aminoácidos, de forma que queda una parte relativamente grande de la proteína sin calcular (235 aminoácidos, es decir el 35% del total), a pesar de que la mayoría corresponda presumiblemente a lazos o bien a estructura desordenada. De acuerdo con estas estimaciones, existen 124 aminoácidos con estructura en hélice α (12 en el dominio C1, 9 en el dominio C2 y 102 en el dominio catalítico), lo cual supone un 19% de la estructura total de la PKC α . Además, hay 168 residuos con estructura en hoja β (39 del dominio C1, 72 del dominio C2 y 57 del dominio catalítico), que representa el 25% de la estructura total de la PKC α . Por otro lado, se han identificado 108 residuos que adoptan la estructura de giros β (35 del dominio C1, 49 del dominio C2 y 24 del dominio catalítico), sumando en total el 16% de la estructura total de la PKC α . Finalmente, el dominio pseudosustrato incluye 37 residuos con, probablemente, una estructura desordenada. Esto supondría 6% de la estructura total de la PKC α .

De los datos mostrados en la Tabla VII.3 lo más sorprendente es el elevado porcentaje de hélice α detectado mediante dicroísmo circular, aunque esta técnica puede tender a sobreestimar dicha estructura (Pribic y col., 1993). De cualquier modo, este valor de hélice α es superior al obtenido por FT-IR e incluso al valor de la estimación realizada a partir de las estructuras tridimensionales conocidas de los dominios de la proteína. No parece que sea posible, en el caso de la estimación de la estructura a partir de las de los distintos dominios, que la parte desconocida (34%) corresponda a hélice α u hoja β , al menos en una elevada proporción, sino que más bien debe suponer probablemente una estructura de tipo lazos o desordenada.

Tabla VII.3. Comparación de la estructura de la PKC α obtenida según diferentes técnicas.

	Hélice- α	Hoja- β	Giros- β	Estructura desordenada	Desconocida
CD ^a (Shah y Shipley)	36	57	7	0	
CD (Boscà y Morán) ^b	40	ND ^c	ND	ND	
FT-IR (este trabajo) ^d	22	49	7	22	
Estimación a partir de las estructuras conocidas de los dominios	19	25	16	6	34

^aDicroísmo circular. ^bSin ningún ligando. ^cNo determinada. ^dEn presencia de 200 μ M EGTA a 20°C.

De cualquier forma, nuestros datos destacan que la presencia de ligandos proporciona cierta protección frente a la desnaturalización térmica de la PKC α . Este hecho es posiblemente más adecuado para observar el enlace a los sitios de alta afinidad de la proteína, ya que normalmente este proceso de unión no provoca grandes cambios en la estructura secundaria de la proteína, sino que afecta probablemente al plegamiento tridimensional. El enlace de ligandos a la proteína puede afectar a la coherencia de la proteína, en la mayoría de los casos aumentando esta característica, de forma que así se observaría protección frente a la desnaturalización. Es curioso el hecho de que ligandos como el Ca²⁺ o el PMA protegen de forma eficaz la estructura de hoja β , mientras que en el caso de la combinación de ligandos (Ca²⁺, ATP, PMA y fosfolípidos aniónicos) se observó una mayor protección de las estructuras de los giros β y la hélice α . Esta protección de la

hélice α puede deberse posiblemente a la interacción con los fosfolípidos, ya que los restantes ligandos presentes en la mezcla, independientemente no tuvieron este efecto.

No obstante, conviene recordar que los comportamientos variados de la PKC α frente a la desnaturalización en presencia de los distintos ligandos podrían reflejar movimientos diferentes en el esqueleto de la proteína y estar así relacionados más con procesos dinámicos que con cambios estructurales, como se comentó en la discusión del anterior Capítulo VI de esta misma Memoria.

El análisis de correlación bidimensional del proceso de desplegamiento térmico proporcionó una interesante información. El espectro de correlación síncrona de la PKC α en presencia de EGTA mostró una correlación negativa entre la hélice α y la agregación de la hoja β . En cambio, en el espectro de correlación síncrona de la muestra en presencia de la combinación de ligandos, la correlación observada fue entre la hoja β y la agregación de la hoja β intermolecular, lo cual está de acuerdo con los resultados previos de FT-IR que sugieren que la presencia de la combinación de ligandos protegería frente a la desnaturalización de la hélice α , probablemente debido a la presencia de fosfolípidos. De acuerdo con la estimación de la estructura secundaria mostrada en la Tabla VII.3, la mayor parte de los aminoácidos que presentan estructura en hélice α se encuentran en el dominio catalítico, el cual es una de las regiones propuestas para la unión a la membrana durante la activación de la PKC (Zidovetzki y Lester, 1992).

El espectro de correlación asíncrona de la PKC α en presencia de EGTA mostró que el desplegamiento sigue cierto orden secuencial en cuanto a los acontecimientos que tienen lugar. De esta forma, en primer lugar ocurriría la desaparición de la hélice α seguida del descenso en la hoja β y finalmente la aparición de la hoja β agregada. En presencia de Ca^{2+} , la correlación más importante fue la que se presentó entre la hoja β agregada y la hélice α , lo cual confirma la conclusión derivada de nuestros estudios de FT-IR donde la unión de Ca^{2+} produjo de alguna manera la protección de la hoja β . Debe destacarse el hecho de que se sabe que el Ca^{2+} se une al dominio C2 de la PKC α , siendo la estructura de este dominio un sándwich de hoja β compacto (Verdaguer y col., 1999). Además se comprobó

anteriormente que la presencia de Ca^{2+} protege a este tipo de estructura en el dominio aislado de la PKC α frente a la desnaturalización térmica (García-García y col., 1999, así como los resultados presentados en esta Memoria en el Capítulo VI). Por ello, es posible que el efecto que se observa con la enzima completa en presencia de Ca^{2+} se deba a su dominio C2. No obstante, según el espectro de correlación asíncrona de la muestra con PMA, la secuencia de sucesos no fue como la anteriormente descrita, sino que la disminución de la hoja β precedió al descenso de la hélice α , lo cual podría estar debido a que este ligando interacciona con el dominio C1 en lugar de con el dominio C2 (Zhang y col., 1995).

En conclusión, se han obtenido interesantes resultados sobre la estructura secundaria de la PKC α y sobre su desplegamiento térmico, a la vez que se ha introducido el uso de una técnica relativamente nueva, como es la correlación bidimensional de la espectroscopía de infrarrojo, demostrando así su utilidad para analizar interacciones complejas entre proteínas y ligandos.

Capítulo VIII

Discusión General y Conclusiones

1. DISCUSIÓN GENERAL.

La familia de la PKC incluye diez isoenzimas en mamíferos clasificadas en tres grandes grupos o subfamilias en función de su estructura primaria y de su requerimiento de cofactores para la regulación de su actividad enzimática. No obstante, incluso dentro de una misma subfamilia se encuentran isoenzimas con diferentes funciones y localizaciones celulares, así como con distintos y precisos mecanismos de regulación. Todas estas diferencias en cuanto a su regulación deben tener relación con alguna característica estructural o funcional de cada isoenzima, localizada principalmente a nivel de la región reguladora, en concreto en los dominios C1 y C2 de la misma. Estos dominios cumplen una función esencial en la regulación de la PKC, ya que están involucrados en la interacción de la proteína con la membrana, lo cual supone un punto clave en el proceso de activación de la PKC. Las isoenzimas clásicas de la PKC están reguladas por diferentes cofactores, como los ésteres de forbol, diacilgliceroles, fosfolípidos aniónicos y Ca^{2+} . Los dos primeros compuestos interactúan con la PKC a nivel del dominio C1, mientras que los fosfolípidos aniónicos y el Ca^{2+} lo hacen a través del dominio C2. Tanto los ésteres de forbol como los DAGs se unen al dominio C1 en la misma región y sin provocar grandes cambios estructurales. Por otro lado, el papel del Ca^{2+} en la regulación de la PKC es esencial para la interacción de la proteína con la membrana y su consecuente activación. Gracias a los datos de la resolución de la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α , se conocen los residuos que intervienen en la unión a Ca^{2+} y fosfolípidos aniónicos, así como el hecho de que el Ca^{2+} tiene un papel de puente en dicha interacción. Por todo ello, consideramos muy importante el estudio de ambos dominios a la hora de intentar dilucidar el proceso de regulación de la PKC. Además, el análisis comparativo de los dominios C2 de una misma subfamilia de la PKC, a nivel de su estructura en ausencia y presencia de diferentes ligandos, así como de su afinidad por los mismos, podría aportar información acerca de las características diferenciales de la regulación de las distintas isoenzimas.

Los ésteres de forbol y los diacilgliceroles interactúan con el dominio C1 de la PKC modulando así la actividad de la proteína. Asimismo, la actividad de la PKC está regulada por las propiedades biofísicas de la membrana. Algunos DAGs son capaces de modificar el comportamiento de fase de los fosfolípidos de la

membrana, produciendo una separación lateral de fases, formando fases sin bicapa o provocando la deshidratación de la membrana. Parte de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral han sido encaminados a analizar la relación entre la activación de la PKC α y las propiedades biofísicas de un sistema modelo de membrana compuesto por fosfolípidos (POPC/POPS) y un diacilglicerol completamente saturado (DPG). El sistema lipídico se caracterizó mediante diferentes técnicas biofísicas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y la resonancia magnética nuclear de ^{31}P (RMN- ^{31}P). A continuación se observó que la PKC α mostró unión y activación en presencia de membranas de este sistema lipídico. Estos resultados podrían estar mediados por la interacción del dominio C2 con los fosfolípidos aniónicos del sistema (POPS) o bien por la actuación del DPG sobre el dominio C1 de la proteína. Para intentar discriminar la región de la PKC α responsable de este efecto, se utilizó el dominio C2 aislado de la misma, así como un mutante de la PKC α (D246/248N) con una alteración en el mismo dominio que muestra una capacidad de unir Ca^{2+} reducida. Se observó que el dominio C2 de la PKC α se enlazó a las membranas de este sistema lipídico, mientras que la proteína mutante fue incapaz de mostrar activación y unión. Para corroborar estos resultados, se analizó el comportamiento de la PKC α en presencia de otro sistema lipídico, incluyendo en esta ocasión un diacilglicerol con una cadena insaturada (POG). Este nuevo sistema modelo fue capaz de promover la unión del dominio C2 aislado de la PKC α , así como la unión y activación de la PKC α . Además, la proteína mutante fue capaz de mostrar unión y activación, a pesar de que necesitó mayores concentraciones de este DAG que la forma silvestre. Estos resultados reflejan la importancia de la presencia de una insaturación en una de las cadenas del diacilglicerol que componen la membrana a la hora de estimular la activación de la PKC α .

El otro punto clave en la regulación de la PKC es el dominio C2. El análisis comparativo de las diferentes características de los dominios C2 de las distintas isoenzimas de una misma subfamilia de la PKC, donde se supone una elevada similitud, resulta de gran interés para poder determinar así los diferentes y precisos mecanismos de regulación que presentan las mismas. Por ello, decidimos estudiar los dominios C2 de tres de las isoenzimas clásicas de la PKC (la PKC α , la PKC β II y la PKC γ), desde puntos de vista diferentes: la afinidad por ligandos y la estructura

secundaria. Para llevar a cabo este análisis, se utilizaron diferentes técnicas biofísicas, como la espectroscopía de fluorescencia, la calorimetría de titulación isotérmica (ITC), la calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la espectroscopía de infrarrojo (FT-IR). Asimismo, se introdujo el análisis de correlación de la espectroscopía de infrarrojo bidimensional (2D-IR) para completar el estudio de la estructura secundaria de estos tres dominios C2, así como del proceso de desnaturalización térmica de los mismos. Esta técnica reciente proporciona una información adicional valiosa para profundizar en el análisis estructural de las proteínas que no era accesible mediante las técnicas anteriores.

La espectroscopía de fluorescencia se ha utilizado ampliamente a la hora de analizar interacciones de proteínas con diversos ligandos, aprovechando la propiedad fluorescente de los residuos de *Trp*. En concreto se estudió la afinidad por Ca^{2+} y membranas con fosfolípidos aniónicos de los dominios C2 de las PKCs clásicas (PKC α , PKC β II y PKC γ) mediante espectroscopía de fluorescencia intrínseca y de transferencia de energía de resonancia (FRET), respectivamente. En ausencia de fosfolípidos, los tres dominios presentaron afinidades similares por Ca^{2+} y cooperatividad, al menos para los dominios C2 de la PKC α y de la PKC γ , indicando así la unión de un mínimo de dos iones Ca^{2+} . En cambio, en presencia de fosfolípidos aniónicos, la afinidad por Ca^{2+} aumentó dos órdenes de magnitud, poniendo así de manifiesto el efecto aditivo de ambos compuestos en el proceso de interacción. En general, si bien las afinidades por Ca^{2+} en presencia de fosfolípidos aniónicos fueron similares y mayores para los dominios C2 de la PKC α y de la PKC β II, el comportamiento del dominio C2 de la PKC γ mostró una mayor capacidad de respuesta frente a pequeños cambios en la concentración de Ca^{2+} , a pesar de que precisó mayores cantidades del ión. Esta diferente capacidad de respuesta frente a los distintos ligandos estaría involucrada en las distintas funcionalidades de las isoenzimas clásicas de la PKC.

Por otro lado, la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) permite determinar la afinidad de una macromolécula por un ligando, midiendo los calores liberados o absorbidos fruto de la interacción. El análisis comparativo de las afinidades de los dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC hacia distintos ligandos como Ca^{2+} y fosfatidilserina mediante esta técnica resulta muy interesante.

La interacción con Ca^{2+} fue similar en los tres casos, mostrando la presencia de dos tipos de sitios de unión. El primero, de alta afinidad, uniría un ión Ca^{2+} de manera exotérmica con una constante de disociación del orden de 1 micromolar. En cambio, el segundo tipo de sitios de unión, de menor afinidad, uniría dos iones Ca^{2+} de manera endotérmica con afinidades diferentes. El dominio C2 de la PKC γ fue el que mostró una afinidad por Ca^{2+} mayor ($K_d = 4,3 \mu\text{M}$), mientras que los dominios C2 de la PKC α y de la PKC β II mostraron afinidades menores pero similares entre sí (22,2 μM y 17,2 μM). En ausencia de Ca^{2+} , los tres dominios unieron fosfatidilserina de forma muy débil ($K_d = 430 \mu\text{M}$) y sin llegar a saturación. En cambio, la presencia de Ca^{2+} aumentó claramente la afinidad de los dominios C2 por fosfatidilserina (18,0 μM para el dominio C2 de la PKC α , 9,7 μM para el dominio C2 de la PKC β II y 18,4 μM para el dominio C2 de la PKC γ), lo cual puso de manifiesto el papel intermediario o puente del Ca^{2+} en la unión a los fosfolípidos aniónicos. Esta unión fue de carácter exotérmico. Las diferencias en la afinidad de los tres dominios C2 de las isoenzimas clásicas de la PKC pueden tener una gran importancia a la hora de intentar explicar las distintas funcionalidades de las diversas isoenzimas de la PKC.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite estudiar la transición de biomoléculas entre diferentes estados, como los cambios de fase en los fosfolípidos o la transición entre la forma nativa y la forma desnaturalizada de una proteína. El estudio de la estabilidad térmica de los tres dominios C2 de las PKCs clásicas en presencia de Ca^{2+} y fosfolípidos mediante DSC resultó bastante complejo. La desnaturalización térmica de los tres dominios C2 resultó irreversible. En general, se observó que la presencia de Ca^{2+} desplazó la transición de las tres proteínas hacia temperaturas mayores, como cabría esperar de la estabilización de la estructura de las proteínas tras la unión de ligando. En presencia de fosfolípidos aniónicos, este desplazamiento fue mayor a la misma concentración de Ca^{2+} , poniendo de manifiesto la acción aditiva de la presencia de ambos ligandos sobre la estabilización de la estructura de las tres proteínas. No obstante, este desplazamiento de la transición fue distinto para los tres dominios, indicando así que, a pesar de que los tres dominios C2 unen Ca^{2+} y fosfolípidos de manera relativamente similar, el significado del Ca^{2+} y fosfolípido unido es distinto para cada uno de ellos, reflejando así las posibles diferencias funcionales de las isoenzimas de una misma subfamilia de la PKC. El proceso de desnaturalización de los tres dominios en presencia de ligando está

caracterizado por la liberación del mismo en una etapa previa a la limitante de la velocidad del proceso. La entalpía de unión de los ligandos fue muy pequeña, de forma que la entalpía de desnaturalización del proceso indicó principalmente el aumento de la capacidad calorífica de la desnaturalización de las proteínas.

El estudio de la estructura secundaria de los tres dominios C2 en presencia de diferentes ligandos supone un paso más en el análisis comparativo de los mismos. La espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) es una de las técnicas más utilizadas a la hora de analizar la estructura de proteínas. Las estructuras tridimensionales de los dominios C2 de la PKC α y de la PKC β I se han resuelto y muestran una alta similitud. Estos dominios presentan una estructura caracterizada por un sándwich β compacto, con dos hojas β con cuatro cadenas cada una. Entre las distintas cadenas β aparecen unos lazos donde residen las propiedades características de cada dominio. A pesar de que no existen datos estructurales sobre el dominio C2 de la PKC γ , la elevada homología de secuencia puede indicar que dicha estructura tridimensional debe ser similar. Los resultados obtenidos de la estructura secundaria de los tres dominios C2 de las PKCs clásicas mediante espectroscopía de infrarrojo fueron coherentes con las estructuras tridimensionales resueltas mediante difracción de rayos-X, poniendo de manifiesto así la validez de los análisis llevados a cabo mediante esta técnica. La estructura secundaria nativa de los tres dominios C2 de la PKC α obtenida mediante FT-IR en ausencia de ligandos mostró el mismo patrón, con una importante contribución de hoja β (50%) y la presencia de una proporción moderada de hélice α (12%). La adición de diferentes concentraciones de Ca²⁺ no modificó la estructura secundaria nativa de los tres dominios C2. Las mayores diferencias se observaron tras la adición de fosfolípidos aniónicos (POPC/POPA) en presencia de Ca²⁺, con un importante descenso de la hoja β (36%) y un aumento de la estructura desordenada (23-24%) y la hélice α (16-18%). Estos cambios podrían reflejar la reordenación estructural de la región implicada en la unión de Ca²⁺ y fosfolípidos. A alta temperatura se observaron las señales características de la desnaturalización térmica proteica: el ensanchamiento de la banda amida I' y la aparición de la hoja β agregada. La adición de ligandos (Ca²⁺ y fosfolípidos) protegió frente a la desnaturalización térmica, de manera que las señales anteriormente comentadas fueron de menor intensidad. La adición de una concentración saturante de Ca²⁺ ofreció una protección total frente a la desnaturalización en el caso de la PKC γ . El patrón de desnaturalización de los tres

dominios fue distinto en cada caso y podría reflejar las diferencias en el movimiento del esqueleto de las proteínas. El análisis de correlación bidimensional de la desnaturalización térmica de los tres dominios C2 en ausencia de ligandos confirmó los resultados anteriores y proporcionó información nueva y valiosa. Los principales cambios en el proceso de desnaturalización térmica recayeron en la hoja β agregada y en la hoja β , como se describió anteriormente. El orden secuencial de los eventos durante esta desnaturalización fue distinto para los tres dominios, ya que la desaparición de la hoja β antiparalela ocurrió antes que la aparición de la hoja β agregada en el caso del dominio C2 de la PKC α , mientras que para los otros dos dominios estos sucesos ocurrieron prácticamente de forma simultánea. Así, para los dominios C2 de la PKC β II y de la PKC γ se observó un “patrón de mariposa”, característico de un desplazamiento espectral, el cual queda enmascarado en el caso del dominio C2 de la PKC α debido a la separación temporal de los sucesos previamente comentados. De esta manera, las diferencias en la interacción con los distintos ligandos, así como en el patrón de desnaturalización podrían estar relacionadas con las diversas funcionalidades de las isoenzimas clásicas de la PKC.

Finalmente, se decidió analizar la estructura secundaria de la PKC α completa purificada mediante FT-IR. Dado que no se han llevado a cabo estudios estructurales previos con la proteína purificada, el interés de este trabajo es muy importante, pues supone el primer acercamiento al análisis de la estructura de una isoenzima de la PKC purificada. La estructura secundaria nativa de la PKC α en ausencia de ligandos muestra una alta contribución de la hoja β (44%). La adición de diferentes ligandos no provocó grandes cambios en la estructura secundaria nativa de la PKC α . Sólo la presencia de Ca²⁺ provocó un aumento de la hoja β (48%), mientras que la presencia de ATP produjo un descenso en la hoja β (40%) y un aumento de los giros β (12%). A alta temperatura se observaron las señales características de desnaturalización térmica, anteriormente citadas. No obstante, la adición de ligandos, sobre todo Ca²⁺ y PMA, produjeron una importante protección frente a esta desnaturalización. No obstante, el variado patrón de desnaturalización de la proteína en presencia de los distintos ligandos podría reflejar las diferencias en el movimiento del esqueleto de la proteína. El análisis de correlación bidimensional corroboró los resultados anteriores y proporcionó nueva información. Los principales cambios en el proceso de desnaturalización recayeron en la hoja β agregada y en la hélice α en todos los casos,

salvo en presencia de una combinación de ligandos con fosfolípidos aniónicos (POPC/POPA), donde estos cambios residieron en la hoja β agregada y en la hoja β , poniendo de manifiesto la posible interacción de los fosfolípidos con el dominio C2 y la región catalítica de la proteína, lugares donde esta componente estructural es mayoritaria. El orden secuencial de acontecimientos fue el siguiente: descenso de la hélice α , descenso de la hoja β y aparición de la hoja β agregada. Este patrón se observó en todos los casos, salvo en presencia de PMA, donde los cambios en la hoja β precedieron a los cambios en la hélice α , lo cual podría estar relacionado con que este compuesto no se une al dominio C2 de la proteína, donde la presencia de hoja β es mayoritaria. Este análisis de la estructura secundaria de la PKC α tiene un gran interés puesto que supone la primera aproximación estructural de una isoenzima de la PKC purificada.

2. CONCLUSIONES.

De los resultados presentados en esta Memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1. La actividad de la PKC α está regulada por diversos factores, como las propiedades de la membrana, así como la presencia de Ca²⁺, DAG y fosfolípidos aniónicos. Los DAGs son capaces de modular el comportamiento de fase de los fosfolípidos de la membrana, de forma que su papel en la regulación de la actividad de la PKC α es muy importante. Así, la presencia de una cadena insaturada en uno de los ácidos grasos del DAG influye claramente sobre la activación de la PKC α .
2. Mediante la espectroscopía de fluorescencia se comprobó que la afinidad de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ por Ca²⁺ en ausencia de fosfolípidos aniónicos fue similar e indicó cooperatividad en todos los casos, salvo para el dominio C2 de la PKC β II. La presencia de fosfolípidos aniónicos provocó el aumento de la afinidad por Ca²⁺ en los tres casos, siendo el dominio C2 de la PKC γ el que mostró una mayor capacidad de respuesta frente a pequeños cambios en la concentración de Ca²⁺, a pesar de que precisó mayores cantidades de dicho ión.

3. La calorimetría de titulación isotérmica permitió cuantificar directamente las afinidades de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ por Ca $^{2+}$ y fosfolípidos aniónicos. En ausencia de membranas, los tres dominios C2 unen Ca $^{2+}$ de forma similar, mostrando la existencia de dos tipos de sitios que enlazarían tres iones Ca $^{2+}$ en total. En presencia de Ca $^{2+}$, la afinidad de los tres dominios por fosfolípidos aniónicos aumentó claramente. La calorimetría diferencial de barrido mostró que la desnaturalización térmica de los tres dominios C2 fue irreversible. La presencia de Ca $^{2+}$ provocó el desplazamiento de la transición hacia temperaturas mayores, siendo este efecto mayor en presencia de fosfolípidos aniónicos. Este desplazamiento fue diferente para los tres dominios reflejando así que la unión de los ligandos tiene un distinto significado.

4. La estructura secundaria de los dominios C2 de la PKC α , de la PKC β II y de la PKC γ mediante FT-IR. mostró una predominancia de la hoja β . La adición de distintas concentraciones de Ca $^{2+}$ no modificó dicha estructura, aunque sí aumentó la estabilidad de los tres dominios frente a la desnaturalización térmica. El dominio C2 de la PKC γ mostró una protección total frente a este proceso en presencia de una concentración de Ca $^{2+}$ saturante. La unión a vesículas compuestas por POPC/POPA mostró una reorganización de la estructura secundaria de los tres dominios, con una disminución de la hoja β y un aumento de la estructura desordenada. El orden secuencial de los eventos que sucedieron durante la desnaturalización térmica fue distinto para las tres proteínas, de forma que los dominios C2 de la PKC β II y de la PKC γ mostraron principalmente las características de un desplazamiento espectral, mientras que en el caso del dominio C2 de la PKC α , la separación temporal entre la desaparición de la hoja β antiparalela y la aparición de la hoja β agregada resultó de mayor importancia.

5. La estructura secundaria nativa de la PKC α en ausencia de ligandos obtenida mediante FT-IR mostró una predominancia de la hoja β (44%). La unión de distintos ligandos (Ca $^{2+}$, ATP, PMA y una combinación de estos ligandos con fosfolípidos aniónicos) no provocó grandes cambios en esta estructura, salvo la adición de Ca $^{2+}$ (que aumentó la hoja β) y la adición de ATP (que redujo la hoja β y aumentó los

giros β). No obstante, la presencia de los ligandos, sobre todo de Ca^{2+} y PMA, provocó un aumento de la estabilidad frente a la desnaturalización térmica. El orden secuencial de los sucesos que tuvieron lugar durante la desnaturalización térmica fue similar en todos los casos, mostrando que los cambios en la hélice α fueron previos a los de la hoja β , y todos estos anteriores a la aparición de la hoja β agregada. No obstante, en presencia de PMA, los cambios en la hoja β precedieron a los de la hélice α .

Bibliografía

- Abbott, T.P., Wolf, W.J., Wu, Y.V., Butterfield, R.O. y Kleiman, R. (1991) *Appl. Spectrosc.* **45**, 1665-1673.
- Abeliovich, A., Paylor, R., Chen, C., Kim, J.J., Wehner, J.M. y Tonegawa, S. (1993) *Cell* **75**, 1263-1271.
- Abrams, C. S., Zhao, W., Belmonte, E. y Brass, L. F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 23317-23321.
- Ahmed, S., Lee, J., Kozma, R., Best, A., Monfries, C. y Lim, L. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10709-10712.
- Akers, R.F., Lovinger, D.M., Colley, P.A., Linden, D.J. y Routtenberg, A. (1986) *Science* **231**, 587-589.
- Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S.-I., Hirai, S.-L., Tanuma, S.-I., Suzuki, K. y Ohno, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 12677-12683.
- Almholt, K., Arkhammar, P.O.G., Thastrup, O. y Tullin, S. (1999) *Biochem. J.* **337**, 211-218.
- Amano, M., Mukai, H., Ono, Y., Chihara, K., Matsui, T., Hamajima, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A. y Kaibuchi, K. (1996) *Science* **271**, 648-650.
- Arnold, R. S. y Cornell, R. B. (1996) *Biochemistry* **35**, 9917-9924.
- Arnold, R. S. y Newton, A. C. (1996) *FEBS Letters* **380**, 58-62.
- Aroca, J.D., Sánchez-Piñera, P., Corbalán-García, S., Conesa-Zamora, P., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J.C. (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 6369-6378.
- Arrondo, J. L. R. y Gofí, F. M. (1999) *Progress Biophys. Mol. Biol.* **72**, 367-405.
- Arrondo, J. L. R., Castresana, J., Valpuesta, J. M. y Gofí, F. M. (1994a) *Biochemistry* **33**, 11650-11655.

- Arrondo, J. L. R., Etxabe, I., Dornberger, U. y Gofí, F. M. (1994b) *Biochem. Soc. Trans.* **22**, 380S.
- Arrondo, J. L. R., Muga, A., Castresana, J., Bernabeu, C. y Gofí, F. M. (1989) *FEBS Letters* **252**, 118-120.
- Arrondo, J.L.R., Gofí, F.M. y Macarulla, J.M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **794**, 164-168.
- Arrondo, J.L.R., Iloro, I., Aguirre, J., and Gofí, F.M. (2003) (*in press*).
- Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J. y Gofí, F.M. (1993) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 23-56.
- Arrondo, J.L.R., Young, N.M. y Mantsch, H.H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **952**, 261-268.
- Asaoka, Y., Yoshida, K., Oka, M., Shinomura, T., Mishima, H., Matsushima, S. y Nishizuka, Y. (1992) *Ciba Found Symp.* **164**, 50-65.
- Ashendel, C. L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 219-242.
- Ataka, K. y Osawa, M. (1998) *Langmuir* **14**, 951-959.
- Baeuerle, P.A., Lenardo, M., Pierce, J.W. y Baltimore, D (1988) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **53**, 789-798.
- Ball, A., Nielsen, R., Gelb, M.H., y Robinson, B.H. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6637-6642.
- Banci, L., Cavallaro, G., Kheifets, V., y Mochly-Rosen, D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 12988-12997.
- Bandekar, J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1120**, 123-143.

- Bandekar, J. y Krimm, S. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 774-777.
- Bangham, A.D., Standish, M.M. y Watkins, J.C. (1965) *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.
- Barenholz, Y. y Thompson, T.E. (1999) *Chem. Phys. Lipids* **102**, 29-34.
- Basbaum, A. I. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7739-7743.
- Batenburg, M.A. y de Kruijff, B. (1988) *Biosci. Rep.* **8**, 299-307.
- Bax, A. (1982) "Two dimensional nuclear magnetic resonance in liquids" Reidel Ed., Boston, U.S.A.
- Bazzi, M. D. y Nelsestuen, G. L. (1987) *Biochemistry* **26**, 115-122.
- Bazzi, M. D. y Nelsestuen, G. L. (1990) *Biochemistry* **29**, 7624-7630.
- Bell, R.M. (1986) *Cell* **45**, 631-632.
- Bell, R.M. y Burns, D.J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4661-4664.
- Benowitz, L.I., Perrone-Bisozero, N.I. y Finklestein, S.P. (1987) *J. Neurochem.* **48**, 1640-1647.
- Berg, J.M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6513-6516.
- Berridge, M. J., Bootman, M.D. y Lipp, P. (1998) *Nature* **395**, 645-648.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bittova, L., Stahelin, R.V. y Cho, W. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 4218-4226.
- Bittova, L., Sumandea, M. y Cho, W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 9665-9672.

- Blobe, G. C., Stribling, D. S., Fabbro, D., Stabel, S. y Hannun, Y. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 15823-15830.
- Blumberg, P.M. (1988) *Cancer Res.* **48**, 1-8.
- Blume, A., Hübner, W. y Messner, G. (1988) *Biochemistry* **27**, 8239-8249.
- Boesch, D.M. y Garvin, J.L. (2001) *Am. J. Physiol.* **281**, R861-R867.
- Boggs, K.P., Rock, C.O. y Jackowski, S.L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 7757-7764.
- Bogi, K., Lorenzo, P.S., Szallasi, Z., Acs, P., Wagner, G.S. y Blumberg, P.M. (1998) *Cancer Res.* **58**, 1423-1428.
- Bolen, E. J. y Sando, J. J. (1992) *Biochemistry* **31**, 5945-5951.
- Boni, L. T. y Rando, R. R. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10819-10825.
- Bornancin, F. y Parker, P.J. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1114-1123.
- Bornancin, F. y Parker, P.J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3544-3549.
- Borner, C., Eppenberger, U. Wyss, R. y Fabbro, D. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2110-2114.
- Borner, C., Filipuzzi, I., Wartmann, M., Eppenberger, U. y Fabbro, D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13902-13909.
- Borner, C., Ueffing, M., Jaken, S., Parker, P.J. y Weinstein, I.B. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 78-86.
- Boscá, L. y Morán, F. (1993) *Biochem. J.* **290**, 827-832.
- Bötcher, C.J.F., Van Gent, C.M. y Priest, C. (1961) *Anal. Chim. Acta* **24**, 203-204.

- Bowling, N., Walsh, R. A., Song, G., Estridge, T., Sandusky, G. E., Fouts, R. L., Mintze, K., Pickard, T., Roden, R., Bristow, M. R., Sabbah, H. N., Mizrahi, J. L., Gromo, G., King, G. L. y Vlahos, C. J. (1999) *Circulation* **99**, 384-391.
- Brandts, J.F. y Lin, L-N. (1990) *Biochemistry* **29**, 6927-2940.
- Brandts, J.F., Qing Hu, C., Lin, L-N. y Mas, M.T. (1989) *Biochemistry* **28**, 8588-8896.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y. y Südhof, T. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25273-25280.
- Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C. y Jahn, R. (1992) *Science* **256**, 1021-1025.
- Brown, R.E. (1998) *J. Cell. Sci.* **111**, 1-9.
- Brumell, J. H., Carig, K. L., Ferguson, D., Tyers, M. y Grisstein, S. (1997) *J. Immunol.* **158**, 4862-4871.
- Bryant, D.T. (1985) *Biochem. J.* **226**, 613-616.
- Bryant, T.N., Watson, H.C. y Wendell, P.L. (1974) *Nature* **247**, 14-17.
- Burns, D. J., Bloomenthal, J., Myung-Ho, L. y Bell, R. M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12044-12051.
- Burns, D.J. y Bell, R.M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 18330-18338.
- Butler, S.L. y Falke, J.J. (1996) *Biochemistry* **35**, 10595-10600.
- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-trappe, I., Diaz-Meco, M.T., Moscat, J., Rapp, U. y Cooper, G.M. (1997) *Mol, Cell Biol.* **17**, 732-741.

- Caloca, M.J., García-Bermejo, ML, Blumberg, P.M., Lewin, N.E., Kremmer, E., Mischak, H., Wang, S., Nacro, K., Bienfait, B., Márquez, V.E. y Kazanietz, M.G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11854-11859.
- Cameron, D. G. y Mantsch, H. H. (1982) *Biophys. J.* **38**, 175-184.
- Cameron, D.G. y Moffatt, D.J. (1984) *J. Test Eval* **12**, 78-85.
- Cameron, D.G. y Moffatt, D.J. (1987) *Appl. Spectrosc.* **41**, 539-544.
- Careaga, C.L. y Falke, J.J. (1992) *J. Mol. Biol.* **226**, 1219-1235.
- Carter, C.A., Parham, G.P. y Chambers, T. (1998) *Pathobiology* **66**, 284-292.
- Casal, H. L. y Mantsch, H. H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **779**, 381-401.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 7847-7851.
- Cazaubon, S., Bornacin, F. y Parker, P. J. (1994) *Biochem. J.* **301**, 443-448.
- Chae, Y.K., Abildgaard, F., Chapman, E.R. y Markley, J.L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25659-25663.
- Chambon, P. (1994) *Semin. Cell Biol.* **5**, 115-125.
- Chan, S.Y., Murakami, K. y Routtenberg, A. (1986) *J. Neurosci.* **6**, 3618-3627.
- Chapline, C., Cottom, J., Tobin, J., Hulmes, H., Crabb, J. y Jaken, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 19482-19489.
- Chapline, C., Mousseau, B., Ramsay, K., Duddy, S., Li, Y., Kiley, S. C. y Jaken, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6417-6422.
- Chapman, D. y Penkett, S.A. (1966) *Nature* **211**, 1304-1305.

- Chapman, D. y Wallach, D.F.H. (1968) *“Biological membranes”* (D. Chapman, ed.). Academic Press, Nueva York.
- Chen, S.G. y Murakami, K. (1992) *Biochem. J.* **282**, 33-39.
- Cheng, K. y Hui, S. W. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **244**, 382-386.
- Cho, W. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 32407-32410.
- Cho, Y., Tigue, A.P. y Talmage, D.A. (1997) *J. Cell Physiol.* **172**, 306-313.
- Choi, P.M., Tchou-Wong, K.M. y Weinstein, I.B. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10**, 4650-4657.
- Chou, M. M., Hou, W., Johnson, J., Graham, L. K., Lee, M. H., Chen, C. S., Newton, A. C., Schaffhausen, B. S. y Toker, A. (1998) *Curr. Biol.* **6**, 1069-1077.
- Chung, S.-H., Song, W.-J., Kim, K., Bednarski, J. J., Chen, J., Prestwich, G. D. y Holz, R. W. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 10240-10248.
- Cladera, J., Galisteo, H. L., Sabes, M., Mateo, P. L. y Padros, E. (1992) *Eur. J. Biochem.* **207**, 581-585.
- Clark, J. D., Lin, L.-L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N. y Knopf, J. L. (1991) *Cell* **65**, 1043-1051.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. y Helling, R. B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**, 3240-3248.
- Conejero-Lara, F. y Mateo, P.L. (1996) *Biochemistry* **35**, 3477-3486.
- Conesa-Zamora, P., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1487**, 246-254.

- Conesa-Zamora, P., Lopez-Andreo, M.J., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2001) *Biochemistry* **40**, 13898-13905.
- Cope, F.O., Howard, B.D. y Bontwell, R.K. (1986) *Experientia* **42**, 1023-1027.
- Corbalán-García, S., García-García, J., Rodríguez-Alfaro, J.A. y Gómez-Fernández, J.C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 4972-4980.
- Corbalán-García, S., Margarit, S.M., Galron, D., Yang, S.S. y Bar-Sagi, D. (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 880-886.
- Corbalán-García, S., Rodríguez-Alfaro, J. A. y Gómez-Fernández, J. C. (1999) *Biochem. J.* **337**, 513-521.
- Corbalán-García, S., Teruel, J.A., Villalain, J. y Gómez-Fernández, J.C. (1994) *Biochemistry* **33**, 8247-8254.
- Cornford, P., Evans, J., Dodson, A., Parsons, K., Woolfenden, A., Neoptolemos, J. y Foster, C. S. (1999) *Am. J. Pathol.* **154**, 137-144.
- Coussens L., Parker P. J., Rhee L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield M. D., Francke U. y Ullrich, A. (1986) *Science* **233**, 859-866.
- Coussens, L., Rhee, L., Parker, P.J. y Ullrich, A. (1987) *DNA* **6**, 389-394.
- Craig, N.J., Duran Alonso, M.B., Hawker, K.L., Shiels, P., Glencorse, T.A., Campbell, J.M., Bennett, N.K., Canham, M., Donald, D., Gardiner, M., Gilmore, D.P., MacDonald, R.J., Maitland, K., McCallion, A.S., Russell, D., Payne, A.P., Sutcliffe, R.G. y Davies, R.W. (2001) *Nat. Neurosci.* **4**, 1061-1062.
- Crawford, J. M. (1996) *Semin. Liver Dis.* **16**, 169-189.
- Creighton, T.E. (1993) *Proteins: structures and molecular properties*, 2ª ed., W.H. Freeman, New York.

- Csukai, M., Chen, C-H., De Matteis, M. A. y Mochly-Rosen, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 29200-29206.
- Cubitt, A.B., Heim, R., Adams, S.R., Boyd, A.E., Gross, L.A. y Tsien, R. Y. (1995) *Trends Biochem. Sci.* **20**, 448-455.
- Cullen, P. J., Hsuan, J. J., Truong, O., Letcher, A. L., Jackson, T. R., Dawson, A. P. y Irvine, R. F. (1995) *Nature* **376**, 527-530.
- Cullis, P.R. y De Kruijff, B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 399-420.
- Cullis, P.R., Hope, M.J. y Tilcock, C.P. (1986) *Chem. Phys. Lipids* **40**, 127-144.
- Cullis, P.R., Hope, M.J., de Kruijff, B., Verkleij, A.J. y Tilcock, C.P.S. (1985) *"Phospholipid and cellular regulation"* (I.F. Kuo, ed). CRS Press, Boca Ratón, Florida.
- Cunningham, B. A., Tsujita, T. y Brockman, H. L. (1989) *Biochemistry* **28**, 32-40.
- Daniel, L.W., Civoli, F., Rogers, M.A., Smitherman, P.K., Raju, P.A. y Roederer, M. (1995) *Cancer Res.* **55**, 4844-4849.
- Das, S. y Rand, R. P. (1986) *Biochemistry* **25**, 2882-2889.
- Davis, K.G., Plyte, S.E., Robertson, S.R., Cooper, A. y Kneale, G.G. (1995) *Biochemistry* **34**, 148-154.
- Davletov, B.A. y Südhof, T.C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26386-26390.
- Dawson, R. M. C., Hemington, N. L. y Irvine, R. F. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117**, 196-201.
- Dean, N., McKay, R., Miraglia, I., Howard, R., Cooper, S., Giddings, J., Nicklin, P., Meister, L., Ziel, R., Geiger, T., Muller, M. y Fabbro, D. (1996) *Cancer Res.* **56**, 3499-3507.

- De Boeck, H. y Zidovetzki, R. (1989) *Biochemistry* **28**, 7439-7446.
- De Boeck, H. y Zidovetzky, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **946**, 244-252.
- Dekker, D.J., Geurts van Kessel, W.S., Klomp, J.P., Pieters, J. y de Kruijff, B. (1983) *Chem. Phys. Lipids* **33**, 93-106.
- Dekker, L. V., Palmer, R. H. y Parker, P. J. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 396-402.
- Dekker, L.V. y Parker, P.J. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 73-77.
- Dekker, L. V. y Parker, P. J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 12747-12753.
- De Kruijff, B. (1997) *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 564-569.
- De Kruijff, B., Cullis, P.R., Verkleij, A.J., Hope, M.J., Van Echteld, C.J.A. y Taraschi, T.F. (1985) *"The enzymes of Biological Membranes"* (A.D. Martonosi, ed.). Plenum Press, Nueva York.
- Dell'Aqua, M.L., Faux, M.C., Thorburn, J., Thorburn, A. y Scott, J.D. (1998) *EMBO J.* **17**, 2246-2260.
- De Luca, L.M. (1991) *FASEB J.* **5**, 2924-2933.
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A. y Messing, R.O. (2000) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **279**, L429-438.
- Denning, M. F., Dlugosz, A. A., Threadgill, D. W., Magnuson, T. y Yuspa, S. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 5325-5331.
- de Riemer, S.A., Strong, J.A., Albert, K.A., Greengard, P. y Kaczmarek, L.K. (1985) *Nature* **313**, 313-316.
- Dessen, A. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1488**, 40-47.

- Dessen, A., Tang, J., Schmidt, H., Stahl, M., Clark, J.D. y Cumming, D.A. (1999) *Cell* **97**, 349-360.
- Diaz-Meco, M.T., Municio, M.M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L. y Moscat, J. (1996) *Cell*. **86**, 777-786.
- Dibble, A. R. G., Hinderliter, A. K., Sando, J. J. y Biltonen, R. L. (1996) *Biophys. J.* **71**, 1877-1890.
- Diomede, L., Bianchi, R., Modest, E.J., Piovani, B., Filippo, B. y Salmona, M. (1992) *Biochem. Pharmacol.* **43**, 803-807.
- Diomede, L., Colotta, F., Piovani, B., Re, F., Modest, E.J. y Salmona, M. (1993) *Int. J. Cancer* **53**, 124-130.
- Dowhan, W. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 199-232.
- Dutil, E.M., Keranen, L.M., DePaoli-Roach, A.A. y Newton, A.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29359-29362.
- Dutil, E. M., Toker, A. y Newton, A. C. (1998) *Curr. Biol.* **8**, 1366-1375.
- Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J. y Stone, J.C. (1998) *Science* **280**, 1082-1086.
- Edge, V., Allewell, N.M. y Sturtevant, J.M. (1985) *Biochemistry* **24**, 5899-5906.
- Edidin, M. (1997) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 528-532.
- Edwards, A. S. y Newton, A. C. (1997a) *Biochemistry* **36**, 15615-15623.
- Edwards, A.S. y Newton, A.C. (1997b) *J. Biol. Chem.* **272**, 18382-18390.
- El Touny, S., Khan, W. y Hannun, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16437-16443.

- Elliot, A. y Ambrose, E.J. (1950) *Nature* **165**, 921-922.
- Epand, R. M. (1985) *Biochemistry* **24**, 7092- 7095.
- Epand, R. M. (1987) *Chem. Biol. Interact.* **63**, 239-247.
- Epand, R. M. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 353-368.
- Epand, R. M. , y Bottega, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **944**, 144-154.
- Epand, R. M. , y Lester, D. S. (1990) *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 317-320.
- Epand, R.M. (2001) *Biosci. Rep.* **20**, 435-441.
- Ernst, C.R., Bodenhausen, G. y Wakaun, A. (1987) "*Principles of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions*" Oxford Univ. Press, Oxford.
- Essen, L. O., Perisic, O., Cheung, R., Katan, M. y Williams, R. L. (1996) *Nature* **380**, 595-602.
- Evans, S.V. y Roger MacKenzie, C. (1999) *J. Mol. Recognit.* **12**, 155-168.
- Fabian, H., Naumann, D., Misselwitz, R., Ristau, O., Gerlach, D. y Welfle, H. (1992) *Biochemistry* **31**, 6532-6538.
- Falke, J.J. (2001) *Biochemistry* **40**, 3089-3100.
- Falke, J.J., Drake, S.K., Hazard, A.L. y Peersen, O.B. (1994) *Q. Rev. Biophys.* **27**, 219-290.
- Faux, M. C. y Scott, J. D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17038-17044.
- Feigenson, G.W. (1986) *Biochemistry* **25**, 5819-5825.

- Fernández, I., Arac, D., Ubach, J., Gerber, S.H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R.G., Sudhof, T.C. y Rizo, J. (2001) *Neuron* **32**, 1057-1069.
- Filimonov, V.V. y Rogov, V.V. (1996) *J. Mol. Biol.* **255**, 767-777.
- Flint, A. J., Paladini, R. D. y Koshland, D. E. Jr. (1990) *Science* **249**, 408-411.
- Fontana, J.A., Reppucci, A., Durham, J.P. y Miranda, D. (1986) *Cancer Res.* **46**, 2468-2473.
- Ford, D.A. y Gross, R.W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 12280-12886.
- Förster, T. (1966) *Modern Quantum Chemistry*, Ed. O. Sinanglu, Sección II-B, 93-137, New York Academic Press.
- Foster, C.S. (1999) *Am. J. Pathol.* **154**, 137-144.
- Fowler, L., Dong, L., Bowes, R.C 3rd, van de Water, B., Stevens, J.L., Jaken, S.L. y Dong, R.C. (1998a) *Cell Growth Differ.* **9**, 177-184.
- Fowler, L., Everitt, J., Stevens, J.L. y Jaken, S.L. (1998b) *Cell Growth Differ.* **9**, 405-413.
- Frank, R.N. (2002) *Am. J. Ophthalmol.* **133**, 693-698.
- Frazier, A.A., Wisner, M.A., Malmberg, N.J., Victor, K.G., Fanucci, G.E., Nalefski, E.A., Falke, J.J. y Cafiso, D.S. (2002) *Biochemistry* **41**, 6282-6292.
- Fukada, H., Sturtevant, J.M. y Quioco, F.A. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13193-13198.
- Fukuda, M., Aruga, J., Niinobe, M., Aimoto, S. y Mikoshiba, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 29206-29211.

- Fukuda, M., Kojima, T., Aruga, J., Niinobe, M. y Mikoshiba, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26523-26527.
- Gallay, J. y de Kruijff, B. (1984) *Eur. J. Biochem.* **142**, 105-112.
- Ganong, B.R., Loomis, C.R., Hannun, Y.A. y Bell, R.M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 1184-1188.
- Gao, T., Toker, A. y Newton, A.C. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 19588-19596.
- García-García, J., Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J. C. (1999) *Biochemistry* **38**, 9667-9675.
- García-García, J., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S (2001) *Eur. J. Biochem.* **268**, 1107-1117.
- Ghosh, S. y Baltimore, D. (1990) *Nature* **344**, 678-682.
- Gil, C., Molina, E., Plana, M., Carabaz, A., Cabre, F., Mauleon, D., Carganico, G. e Itarte, E. (1996) *Biochem. Pharmacol.* **52**, 1843-1847.
- Gill, S.C. y von Hippel, P.H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Goldberg, E. M., Lester, D. S., Borchardt, D. B. y Zidovetzki, R. (1994) *Biophys. J.* **66**, 382-393.
- Goldberg, E. M. y Zidovetzki, R. (1998) *Biochemistry* **37**, 5623-5632.
- Goldstein, D.R., Cacace, A.M. y Weinstein, I.B. (1995) *Carcinogenesis* **16**, 1121-1126.
- Gofii, F.M. y Alonso, A. (1999) *Prog. Lipid Res.* **38**, 1-48.
- González, M., Bagatolli, L.A., Echabe, I., Arrondo, J.L.R., Argarana, C.E., Cantor, C.R. y Fidelio, G.D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 11288-11294.

- Goodnight, J., Mischak, H., Kolch, W. y Mushinski, J.F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 9991-10001.
- Goormaghtigh, E., de Mentter, J.M., Vanloo, B., Brasseur, R., Rossenen, M. y Ruyschaert, J.M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1006**, 147-150.
- Grobler, J. A., Essen, L. O., Williams, R. L. y Hurley, J. H. (1996) *Nat. Struct. Biol.* **3**, 788-795.
- Grobler, J.A. y Hurley, J.H. (1998) *Biochemistry* **37**, 5020-5028.
- Gruner, S.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 3665-3669.
- Gruner, S.M. (1989) *J. Phys. Chem.* **93**, 7562-7570.
- Grunicke, H., Hofman, J., Maly, K., Uberall, F., Posch, L., Oberhuber, H. y Fiebig, H. (1989) *Adv. Enzyme Regul.* **28**, 201-216.
- Gschwendt, M., Johannes, F.-J., Kittstein, W. y Marks, F. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 20742-20746.
- Guan, K.L. y Dixon, J.E. (1991) *Anal. Biochem.* **192**, 262-267.
- Gudas, L.J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15399-15402.
- Haleem-Smith, H., Chang, EY., Szallasi, Z., Blumberg, P.M. y Rivera, J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9112-9116.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988) *Science* **241**, 42-52.
- Hannun, Y. A. y Bell, R. M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 9341-9347.
- Hannun, Y. A., Loomis, C. R. y Bell, R. M. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7184-7190.
- Hannun, Y. A., Loomis, C. R. y Bell, R. M. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 10039-10045.

- Harrison, P.T. (1996) *Mol. Membr. Biol.* **13**, 67-79.
- Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.C. y Aderem, A. (1992) *Nature* **356**, 618-622.
- Hauser, H. y Shipley, G. G. (1984) *Biochemistry* **23**, 34-41.
- Haydon, D.A. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **264**, 2-16.
- Hazard, A.L., Kohout, S.C., Stricker, N.L., Putkey, J.A. y Falke, J.J. (1998) *Protein Sci.* **7**, 2451-2459.
- Heesbeen, E.C., Verdonck, L.F., Staal, G.E.J. y Rijksen, G. (1994) *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1481-1488.
- Heesbeen, E.C., Verdonck, L.F., Hermans, S.W.G., Van Heugten, H.G., Stall, G.E.J. y Rijksen, G. (1991) *FEBS Lett.* **290**, 231-234.
- Heimburg, T., Schuenemann, J., Weber, K. y Geisler, N. (1996) *Biochemistry* **35**, 1375-1382.
- Heimburg, T., Würz, U. y Marsh, D. (1992) *Biophys. J.* **63**, 1369-1378.
- Heitz, F. y Van Mau, N. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1597**, 1-11.
- Helfrich, W. (1973) *Z. Naturforsch.* **C28**, 693-703.
- Hendrix, M.J., Wood, W.R., Seftor, E.A., Lotan, D., Nakajima, M., Misiorowski, R.L., Seftor, R.E., Setler-Stevenson, W.G., Bevacqua, S.J. y Liotta, L.A. (1990) *Cancer Res.* **46**, 4121-4130.
- Herzyck, E., Lee, D.C., Dunn, R.C., Bruckdorf, K.R. y Chapman, D. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **988**, 75-79.

- Hinderliter, A. K., Dibble, A. R. G., Biltonen, R. L. y Sando, J. J. (1997) *Biochemistry*. **36**, 6141-6148.
- Hocevar, B.A. y Fields, A.P. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 28-33.
- Hodgkin, M. N., Pettitt, T. R., Martin, A., Michell, R. H., Pemberton, A. J. y Wakelam, M. J. O. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 200-204.
- Hofmann, J. (1997) *FASEB J.* **11**, 649-669.
- Hofmann, J. (2001) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **142**, 1-96.
- Holbrook, P.G., Pannell, L.K., Murata, Y. y Daly, J.W. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 16834-16840.
- Holdgate, G.A., Tunnicliffe, A., Ward, W.H., Weston, S.A., Rosenbrock, G., Barth, P.T., Taylor, I.W., Pauptit, R.A. y Timms, D. (1997) *Biochemistry* **36**, 9663-9673.
- Holopainen, J. M., Lehtonen, J. Y. y Kinnunen, P. K. (1999) *Biophys. J.* **76**, 2111-2120.
- Hommel, U., Zurini, M. y Luyten, M. (1994) *Struct. Biol.* **1**, 383-387.
- Hosfield, C.M., Ye, Q., Arthur, J.S., Hegadorn, C., Croall, D.E., Elce, J.S. y Jia, Z. (1999) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **55**, 1484-1486.
- House, C. y Kemp, B. E. (1987) *Science* **238**, 1726-1728.
- Housey, G.M., Johnson, M.D., Hsiao, W.L., O'Brian, C.A., Murphy, J.P., Kirschmeier, P. y Weinstein, I.B. (1988) *Cell* **52**, 343-354.
- Hovius, R., Valloton, P., Wohland, T. y Vogel, H. (2000) *Trends Pharmac. Sci.* **27**, 266-273.

- Hoyos, B., Imam, A., Chua, R., Swenson, C., Tong, G.X., Levi, E., Noy, N. y Hammerling, U. (2000) *J. Exp. Med.* **192**, 835-846.
- Hsu, S.L., Chen, M.C., Chou, Y.H., Hwang, G.Y. y Yin, S.C. (1999) *Exp. Cell Res.* **248**, 87-96.
- Hu, C.Q. y Sturtevant, J.M. (1989) *Biochemistry* **28**, 813-818.
- Huang, C. (1969) *Biochemistry* **8**, 344-352.
- Huang, K.-P. y Huang, F. L. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 320-326.
- Hubbard, S. R., Bishop, W. R., Kirschmeier, P., George, S. J., Cramer, S. P. y Hendrickson, W. A. (1991) *Science* **254**, 1776-1779.
- Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J., Chen, C. H., Mochly-Rosen, D. y Messing, R. O. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15028-15035.
- Hurley, J.H. y Misra, S. (2000) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 49-79.
- Hurley, J.H. y Meyer, T. (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 146-152.
- Ichikawa, S., Hatanaka, H., Takeuchi, Y., Ohno, S. y Inagaki, F. (1995) *J. Biochem. (Tokyo)* **117**, 566-574.
- Iglesias, T. y Rozengurt, T. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 410-416.
- Inoguchi, T., Battan, R., Handler, E., Sportsman, J.R., Heath, W., and King, G.L. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 11059-11063.
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. y Nishizuka, Y. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7610-7616.
- Irie, K., Oie, K., Nakahara, A., Yanai, Y., Ohigashi, H., Wender, P.A., Fukuda, H., Konishi, H. y Kikkawa, U. (1998) *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 9159-9167.

- Ish-Horowicz, D. y Burke, J.F. (1981) *Nucleic Acids Research* **9**, 2989-2998.
- Israelachvili, J.N., Marcelja, S.Y. y Horn, R.G. (1980) *Q. Rev. Biophys.* **13**, 121-200.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kempfues, K.J. y Ohno, S (1998) *J. Cell. Biol.* **143**, 95-106.
- Jackson, M.B. (1976) *Biochemistry* **15**, 2555-2561.
- Jaken, S. (1996) *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 168-173.
- Jaken, S., Leach, K. y Klauck, T (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 697-704.
- Jarpe, M.B., Leach, K.L. y Raben, D.M. (1994) *Biochemistry* **33**, 526-534.
- Jelesarov, I. y Bosshard, H.R. (1999) *J. Mol. Recog.* **12**, 3-18.
- Jiménez-Monreal, A. M., Aranda, F. J., Micol, V., Sánchez-Piñera, P., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J. C. (1999) *Biochemistry* **38**, 7747-7754.
- Johannes, F. J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P. y Pfizenmain, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 6140-6148.
- Johnson, J.E., Giorgione, J. y Newton, A.C. (2000) *Biochemistry* **39**, 11360-11369.
- Johnson, L., Grey, M. y Mochly-Rosen, D. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24962-24966.
- Kaibuchi, K., Takai, Y. y Nishizuka, Y. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 7146-7149.
- Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T. y Nisizhuka, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 6701-6704.
- Katan M. y Allen V. L. (1999) *FEBS Lett.* **452**, 36-40.

- Kauppinen, J.K., Moffat, D.J., Mantsch, H.H. y Cameron D.G. (1981) *Appl. Spectrosc.* **35**, 271-276.
- Kauppinen, J.K., Moffat, D.J., Mantsch, H.H. y Cameron, D.G. (1981) *Appl. Spectrosc.* **35**, 271-276.
- Kazanietz, M.G. (2000) *Mol. Carcinog.* **28**, 5-11.
- Kemp, B. E. y Pearson, R. B. (1990) *Trends Biochem Sci.* **15**, 342-346.
- Keränen, L. M. y Newton A. C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 25959-25967.
- Keränen, L.M., Dutil, E.M. y Newton, A.C. (1995) *Curr.Biol.* **5**, 1394-1403.
- Khan, W. A., Blobe, G. C. y Hannun, Y. A. (1995) *Cell. Signal.* **7**, 171-184.
- Khuri, F.R., Cho, Y. y Talmage, D.A. (1996) *Cell Growth Differ.* **7**, 595-602.
- Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1986) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **2**, 149-178.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. y Nishizuka, Y. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 11442-11445.
- Kiley, S. y Parker, P. J. (1995) *J. Cell Sci.* **108**, 1003-1016.
- Kinnunen, P.K., Koiv, A., Lehtonen, J.Y., Rytömaa, M. y Mustonen, P. (1994) *Chem. Phys. Lipids* **73**, 181-207.
- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 2273-2276.
- Kiss, Z. y Crilly, K.S. (1997) *FEBS Lett.* **412**, 313-317.
- Kitagawa, Y., Matsuo, Y., Minowada, J. y Nishizuka, Y. (1991) *FEBS Letters* **288**, 37-40.

Klauck, T. M., Faux, M. C., Labudda, K., Langeberg, L. K., Jaken, S. y Scott, J. D. (1996) *Science* **271**, 1589-1592.

Knighton, K., Zheng, J., Teneyek, L., Ashford, V., Xuong, N., Taylor, S. y Sowadski, J. (1991) *Science* **253**, 407-414.

Knopf, J. L., Lee, M.-H., Sultzman, L. A., Kriz, R. R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M. y Bell, R. M. (1986) *Cell* **46**, 491-502.

Kodali, D. R., Fahey, D. A. y Small, D. M. (1990) *Biochemistry* **29**, 10771-10779.

Kohout, S.C., Corbalan-Garcia, S., Torrecillas, A., Gomez-Fernandez, J.C. y Falke, J.J. (2002) *Biochemistry* **41**, 11411-11424.

König, B., DiNitto, P. A. y Blumberg, P. M. (1985) *J. Cell. Biochem.* **29**, 37-44.

Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11233-11237.

Kosano, H. y Takatani, O. (1988) *Cancer Res.* **48**, 6033-6036.

Krimm, S. y Bandekar, J., (1980) *Biopolymers* **19**, 1-29.

Krimm, S. y Bandekar, J. (1986) *Adv. Protein Chem.* **38**, 181-364.

Kriz, R., Lin, L.-L., Sultzman, L., Ellis, C., Heldin, C.-H., Pawson, T. y Knopf, J. (1990) *Ciba Found Symp.* **150**, 112-127.

Kuksis, A., Myher, J.J., Geher, K., Hoffman, A.G., Breckenridge, W.C., Jones, G.J. y Little, J.A. (1978) *J. Chromatogr.* **146**, 393-421.

Kuksis, A., Myher, J.J., Marai, L. y Geher, K. (1975) *J. Chromatogr. Sci.* **13**, 423-430.

- Kuroda, S., Tokunaga, C., Kiyohara, Y., Higuchi, O., Konishi, H., Mizuno, K., Gill, G.N. y Kikkawa, U. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31029-31032.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
- Lakowicz, J.R. (1983) *"Principles of Fluorescence Spectroscopy"* Plenum Publishing Corporation, New York.
- Lassegue, B., Alexander, R.W., Clark, M., Akers, M y Griendling, K.K. (1993) *Biochem. J.* **292**, 509-517.
- Le Good, J. A., Ziegler, W. H., Parekh, D. B., Alessi, D. R., Cohen, P., y Parker, P. J. (1998) *Science* **281**, 2042-2045.
- Lee, A.G. (1975) *Biochemistry* **14**, 4397-4402.
- Lee, A.G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 381-390.
- Lee, C., Fisher, S.K., Agranoff, B.W. y Hajra, A.K. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 22837-22846.
- Lee, J.-O., Yang, H., Georgescu, M.-M., Cristofano, A. D., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J. E., Pandolfi, P. y Pavletich, N. P. (1999) *Cell* **99**, 323-334.
- Lee, M.H. y Bell, R.M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14797-14805.
- Lee, M.H. y Bell, R.M. (1991) *Biochemistry* **30**, 1041-1049.
- Lee, M.H. y Bell, R.M. (1992) *Biochemistry*. **31**, 5176-5182.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. (1993) *Principios de Bioquímica* (2ª Edición, ed. Omega).
- Leitges, M., Schmedt, C., Guinamard, R., Davoust, J., Schaal, S., Stabel, S. y Tarakhovsky A. (1996) *Science* **273**, 788-791.

- Lemieux, G.A. y Bertozzi, C.R. (1998) *Trends Biotechnol.* **16**, 506-513.
- Lenardo, M.J. y Baltimore, D. (1989) *Cell* **58**, 227-229.
- Lester, D.S., Doll, L., Brumfeld, V. y Miller, I.R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1039**, 33-41.
- Leventhal, P. S. y Bertics, P. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 13906-13913.
- Lewis, R.N.A.H., McElhaney, R.N., Dohle, W. y Mantsch, H.H. (1994) *Biophys. J.* **67**, 2367-2375.
- Li, C., Ullrich, B., Zhang, J. Z., Anderson, R. G. W., Bzor, N. y Südhof, T. C. (1995) *Nature* **375**, 594-599.
- Li, W., Chen, X. H., Kelley, C. A., Alimandi, M., Zhang, J., Chen, Q., Bottaro, D. P. y Pierce, J. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 26404-26409.
- Li, W., Mischak, H., Yu, J. C., Wang, L. M., Mushinski, J. F., Heidarani, M. A. y Pierce, J. H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2349-2352.
- Li, W. Q., Zhang, J. C., Bottaro, D. P., Li, W. y Pierce, J. H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24550-24555.
- Lin, C. R., Chen, W. S., Lazar, C. S., Carpenter, C. D., Gill, G. N., Evans, R. M. y Rosenfeld, M. G. (1986) *Cell* **44**, 839-848.
- Lin, L.N., Mason, A.B., Woodworth, R.C. y Brandts, J.F. (1994) *Biochemistry* **33**, 1861-1888.
- Linse, S., Helmersson, A. y Forsen, S. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 8050-8054.
- Liszewski, M.K. y Atkinson, J.P. (1992) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **178**, 45-60.

- Llosas, M.D., Batlle, E., Coll, O., Skoudy, A., Fabre, M. y Garcia de Herreros, A. (1996) *Biochem. J.* **315**, 1049-1054.
- López-García, F., Micol, V., Villalain, J. y Gómez-Fernández, J. C. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1169**, 264-272.
- López-García, F., Villalain, J., y Gómez-Fernández, J. C. (1994a) *Biochim. Biophys. Acta* **1190**, 264-272.
- López-García, F., Villalain, J., Gómez-Fernández, J.C. y Quinn, P.J. (1994b) *Biophys. J.* **66**, 1991-2004.
- Luo, J. H., Xing, W. Q. y Weinstein, I. B. (1995) *Carcinogenesis* **16**, 897-905.
- Luo, J.H., Kahn, S., O'Driscoll, K. y Weinstein, I.B. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 3715-3719.
- Luo, Z., Díaz, B., Marshall, M. S. y Avruch, J. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 46-53.
- Luzzati, V. (1968) *Biological membranes: Physical fact and function* (D. Chapman, ed.) **1**, 71-123. Academic Press, London.
- Luzzati, V. (1997) *Curr. Op. Str. Biol.* **7**, 661-668.
- Luzzati, V., Vargas, R., Gulik, A., Mariani, P., Seddon, J. M., y Rivas, E. (1992) *Biochemistry* **31**, 279-285.
- Maekawa, M., Iwamatsu, A., Morishita, T., Yokaota, K., Imai, Y., Kohsaka, S., Nakamura, S. y Hattori, S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6879-6885.
- Magee, T. y Marshall, C. (1999) *Cell* **98**, 9-12.
- Magtoto, N.P., Sefara, N.L. y Richardson, H.H. (1999) *Appl. Spectrosc.* **53**, 178-183.
- Makowske, M. y Rosen, O. M. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 16155-16159.

- Mantsch, H.H. y McElhaney, R.N. (1991) *Chem. Phys. Lipids* **57**, 213-226.
- Mantsch, H.H., Perczel, A., Hollosi, M. y Fasman, G.D. (1993) *Biopolymers* **33**, 207-210.
- Marais, R. y Marshall, C.J. (1996) *Cancer Surv.* **27**, 101-125.
- Marcott, C., Dowrey, A.E. y Noda, I. (1994) *Anal. Chem.* **66**, 1065A-1075A.
- Marsh, D. (1980) *Biochemistry* **19**, 1632-1637.
- Martin, T.W. (1988) *Biochim Biophys. Acta* **962**, 282-296.
- Martin, W.J., Malmberg, A.B. y Basbaum, A.I. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 5321-5327.
- Mayer, L.D., Bally, M.B., Hope, M.J. y Cullis, P.R. (1986b) *Chem. Phys. Lipids* **40**, 333-345.
- Mayer, L.D., Hope, M.J. y Cullis, P.R. (1986a) *Biochim. Biophys. Acta* **858**, 161-168.
- McClure, W.L., Maeda, H., Dong, J., Liu, Y. y Ozaki, Y. (1996) *Appl. Spectrosc.* **50**, 467-475.
- McElhaney, R.N. (1975) *Biophys. J.* **15**, 777-784.
- McPhail, L., Clayton, C. y Snyderman, R. (1984) *Science* **224**, 622-625.
- Medkova, M. y Cho, W. (1998a) *J. Biol. Chem.* **273**, 17544-17552.
- Medkova, M. y Cho, W. (1998b) *Biochemistry* **37**, 4892-4900.
- Medkova, M. y Cho, W. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19852-19861.
- Melloni, E., Ponteremoli, S., Michetti, M., Sacco, O., Sparatore, B. y Horecker, B.L.

- (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 4101-4105.
- Mellor, H. y Parker, P. J. (1998) *Biochem. J.* **332**, 281-292.
- Micol, V., Sánchez-Piñera, P., Villalain, J., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J. C. (1999) *Biophys. J.* **76**, 916-927.
- Mineo, C., Ying, Y. S., Chapline, C., Jaken, S. y Anderson, R. G. (1998) *J. Cell Biol.* **141**, 601-610.
- Mitchell, D.C. y Litman, B.J. (1998) *Biophys. J.* **75**, 896-908.
- Miyazawa, T., Shimanouchi, T. y Mizushima, T. (1958) *J. Chem. Phys.* **29**, 611-615.
- Mochly-Rosen, D. (1995) *Science* **268**, 247-251.
- Mochly-Rosen, D. y Gordon, A.S. (1998) *FASEB J.* **12**, 35-42.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H. y López, J. (1991a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 3997-4000.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., López, J. y Smith, B. L. (1991b) *J. Biol. Chem.* **266**, 14866-14868.
- Mochly-Rosen, D., Miller, K. G., Scheller, R. H., Khaner, H., López, J. y Smith, B. L. (1992) *Biochemistry* **31**, 8120-8124.
- Molleyres, L.P. y Rando, R.R. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 14832-14838.
- Mollinedo, F., Martínez-Dalmau, R. y Modolell, M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 603-609.
- Mosior, M. y Epand, R. M. (1993) *Biochemistry* **32**, 66-75.
- Mosior, M. y Newton, A. C. (1996) *Biochemistry* **35**, 1612-1623.

- Mosior, M. y Newton, A. C. (1998) *Biochemistry* **37**, 17271-17279.
- Mosior, M., Golini, E. S. y Epand, R. M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 1907-1912.
- Mott, H. R., Carpenter, J. W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R. M. y Campbell, S. L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8312-8317.
- Muga, A., Arrondo, J. L. R., Bellon, T., Sancho, J., y Bernabeu, C. (1993) *Archiv. Biochem. Biophys.* **300**, 451-457.
- Mukai, H y Ono, Y. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 897-904.
- Mukai, H., Kitigawa, M., shibata, H., Takanaga, H., Mori, K., Shimakawa, M., Miyahara, M., Hirao, K. y Ono, Y. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 348-356.
- Murakami, K., Chan, S. y Routtenberg, A (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 15424-15429.
- Murray, D. y Honig, B. (2002) *Mol. Cell* **9**,145-154.
- Murray, N.R., Davidson, L.A., Chapkin, R.S., Clay Gustafson, W., Schattenberg, D.G. y Fields, A.P. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 699-711.
- Myat, M.M., Anderson, S., Allen, L.A. y Aderem, A. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 611-614.
- Nagle, J.F. y Tristram-Nagle, S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1469**, 159-195.
- Nalefski, E.A. y Falke, J.J. (1996) *Protein Sci.* **5**, 2375-2390.
- Nalefski, E.A. y Falke, J.J. (1998) *Biochemistry* **37**, 17642-17650.
- Nalefski, E.A., McDonagh, T., Somers, W., Seehra, J., Falke, J.J. y Clark, J.D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1365-1372.

- Nalefski, E. A., Slazas, M.M. y Falke, J.J. (1997) *Biochemistry* **36**, 12011-12018.
- Nalefski, E.A. y Newton, A.C. (2001) *Biochemistry* **40**, 13216-13229.
- Nauert, J. B., Klauck, T. M., Langeberg, L. K. y Scott, J. D. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 752-762.
- Needham, J.V., Chen, T.Y. y Falke, J.J. (1993) *Biochemistry* **32**, 3363-3367.
- Neri, L.M., Bortul, R., Borgatti, P., Tabellini, G., Baldini, G., Capitani, S. y Martelli, A.M. (2002) *Mol. Biol. Cell* **13**, 947-964.
- Newman, R.H., Carpenter, E., Freemont, P.S., Blundell, T.L. y Parker, P.J. (1994) *Biochem. J.* **298**, 391-393.
- Newton, A. C. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 21-25.
- Newton, A. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 28495-28498.
- Newton, A. C. (1997) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 161-167.
- Newton, A. C. y Johnson, J. E. (1998) *Biochim. Bioph. Acta* **1376**, 155-172.
- Newton, A. C. y Keranen, L. M. (1994) *Biochemistry* **33**, 6651-6658.
- Newton, A. C. y Koshland, D. E. Jr. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14909-14915.
- Newton, A.C. (2001) *Chem Rev* **101**, 2353-2364.
- Nieva, J. L., Gofí, F. M. y Alonso, A. (1989) *Biochemistry* **28**, 7364-7367.
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.J., Songyang, Z. y Cantley, L.C. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 952-960.
- Nishizuka, Y. (1984) *Nature* **308**, 693-698.

- Nishizuka, Y. (1986) *Science* **233**, 305-312.
- Nishizuka, Y. (1988) *Nature* **334**, 661-665.
- Nishizuka, Y. (1992) *Science* **258**, 607-614.
- Nishizuka, Y. (1995) *FASEB J.* **9**, 484-496.
- Noda, I. (1989) *J. Am. Chem. Society* **111**, 8116-8118.
- Noda, I. (1993) *Appl. Spectrosc.* **47**, 1329-1336.
- Noda, I., Dowrey, A.E., Marcott, C., Story, G.M. y Ozaki, Y. (2000) *Appl. Spectrosc.* **54**, 236A-248A.
- Noda, I., Dowrey, A.E., y Marcott, C. (1999) "Modern Polymer Spectroscopy" (G. Zerbi, ed.), 1-32. Wiley-VCH, Weisheim.
- Oancea, E. y Meyer, T. (1998) *Cell* **95**, 307-318.
- Ochoa, W.F., Corbalán-García, S., Eritja, R., Rodríguez-Alfaro, J.A., Gómez-Fernández, J.C., Fita, I. y Verdaguer, N. (2002) *J. Mol. Biol.* **320**, 277-291.
- Ochoa, W.F., García-García, J., Fita, I., Corbalán-García, S., Verdaguer, N. y Gómez-Fernández, J.C. (2001) *J. Mol. Biol.* **311**, 837-849.
- Ohno, S., Akita, Y., Hata, A., Osada, S., Kubo, K., Konno, Y., Akimoto, K., Mizuno, K., Saido, T., Kuroki, T. y Suzuki, K. (1991) *Adv. Enzyme Regul.* **31**, 287-303.
- Ohno, S., Akita, Y., Konno, Y., Imajoh, S. y Suzuki, K. (1988) *Cell* **53**, 731-741.
- Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A. y Suzuki, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6296-6300.
- Oldfield, E. y Chapman, D. (1972) *FEBS Lett.* **23**, 285-297.

- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kikkawa, U., Ogita, K. y Nishizuka, Y. (1988a) *Nucleic Acids Res.* **16**, 5199-5200.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K y Nishizuka, Y. (1988b) *J. Biol. Chem.* **263**, 6927-6932.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. (1987a) *FEBS Lett.* **226**, 125-128.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3099-3103.
- Ono, Y., K., Kikkawa, U., Ogita, K., Fujii, T., Kurokawa, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K y Nishizuka, Y. (1987b) *Science* **236**, 1116-1120.
- Op den Kamp, J.A (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 47-71.
- Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Komura, R., Ohtsuka, T., Maeda, M., Suzuki, H., Igarashi, H. y Takai, Y. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**, 439-448.
- Orr, J. W. y Newton, A. C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 27715-27718.
- Orr, J.W., Keranen, L.M. y Newton, A.C. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 15263-15266.
- Orr, W. y Newton, A. C. (1992) *Biochemistry* **31**, 4667-4673.
- Ortiz, A., Aranda, F. J., Villalaín, J., San Martín, C., Micol, V. y Gómez-Fernández, J. C. (1992) *Chem. Phys. Lipids* **62**, 215-224.
- Ortiz, A., Villalaín J. y Gómez-Fernández, J. C. (1988) *Biochemistry* **27**, 9030-9036.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T. C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T. y Ohno, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 22434-22440.

- Osada, S.-I., Mizuno, K., Saido, T. C., Suzuki, K., Kuroki, T. y Onho, S. (1992) *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3930-3938.
- Ozaki, Y., Liu, Y. y Noda, I. (1997) *Appl. Spectrosc.* **51**, 526-537.
- Ozaki, Y., Murayama, Wu, Y. y Czarnik-Matuszewicz, B. (2003) *Spectroscopy* **17**, 79-100
- Pacold, M.E., Suire, S., Perisic, O., Lara-González, S., Davis, C.T., Walker, E.H., Hawkins, P.T., Stephens, L., Eccleston, J.F. y Williams, R.L. (2000) *Cell* **103**, 931-943.
- Palmer, R. H., Dekker, L. V., Woscholski, R., Le Good, J. A., Gigg, R. y Parker, P. J. (1995b) *J. Biol. Chem.* **270**, 22412-22416.
- Palmer, R.H., Ridden, J. y Parker, P.J. (1995a) *Eur. J. Biochem.* **277**, 344-351.
- Papahadjopoulos, D., Poste, G., Schaeffer, B. E., y Vail, W.J. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **352**, 10-28.
- Papahadjopoulos, D., Vail, W. J., Jacobson, K. y Poste, G. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **394**, 483-491.
- Pappa, H., Murray-Rust, J., Dekker, L. V., Parker, P. J. y McDonald, N. Q. (1998) *Structure* **6**, 885-894.
- Parekh, D. B., Wolfgang, Z. y Parker, P. J. (2000) *EMBO J.* **19**, 496-503.
- Parker, J., Daniel, L.M. y Waite, M. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 5385-5393.
- Parker, P. J., Coussens, L., Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M. D. y Ullrich, A. (1986) *Science* **233**, 853-859.
- Patel, G. y Stabel, S. (1989) *Cell. Signalling* **1**, 227-240.

- Pears, C. J., Kour, G., House, C., Kemp, B. E. y Parker, P. J. (1990) *Eur. J. Biochem.* **194**, 89-94.
- Pears, C. J., Schaap, D. y Parker, P. J. (1991) *Biochem. J.* **276**, 257-260.
- Pears, C., Stabel, S., Cazaubon, S y Parker, P.J. (1992) *Biochem. J.* **283**, 515-518.
- Peersen, O.B., Madsen, T. S. y Falke, J.J. (1997) *Protein Sci.* **6**, 794-807.
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R. y Südhof, T. C. (1990) *Nature* **345**, 260-263.
- Perisic, O., Fong S., Lynch D. E., Bycroft, M. y Williams R. L. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 1596-1604.
- Plant, P. J., Yeger, H., Staub, O., Howard, P. y Rotin, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 32329-32336.
- Ponting, C. P. y Parker, P. J. (1996) *Protein Sci.* **5**, 162-166.
- Powis, G., Seewald, M.J., Gratas, C., Melder, D., Riebow, J. y Modest, E.J. (1992) *Cancer Res.* **52**, 2835-2840.
- Prekeris, R., Mayhew, M.W., Cooper, J.B. y Terrian, D.D. (1996) *J. Cell Biol.* **132**, 77-90
- Pribic, R., Van Stokkum, I.H., Chapman, D., Haris, P.I. y Bloemendal, M. (1993) *Anal. Biochem.* **214**, 366-378.
- Puls, A., Schmidt, S., Grawe, F. y Sabel, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 6191-6196.
- Quest, A. F. G., Bloomenthal, J., Bardes, E. S. G. y Bell, R. M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10193-10197.

- Quinn, P.J. y Chapman, D. (1980) *CRC. Crit. Rev. Biochemistry* **8**, 1-117.
- Quinn, P. J., Takahashi, H. y Hatta, I. (1995) *Biophys. J.* **68**, 1374-1382.
- Radomska-Pandya, A., Chen, G., Czernik, P.J., Little, J.M., Samokyszyn, V., Carter, C.A. y Nowak, G. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 22324-22330.
- Rando, R.R. y Kishi, Y. (1992) *Biochemistry* **31**, 2211-2218.
- Rebbechi, M., Peterson, A. y McLaughlin, S. (1992) *Biochemistry* **31**, 12742-12747.
- Reisdorf, C., Abergel, D., Bontems, F., Lallemand, J.Y., Decottignies, J.P. y Spik, G. (1994) *Eur. J. Biochem.* **224**, 811-822.
- Reisdorf, W.C. y Krimm, S. (1996) *Biochemistry* **35**, 1383-1386.
- Rhee, S. G., Suh, P.-G., Ryu, S.-H. y Lee, S. Y. (1989) *Science* **244**, 546-550.
- Rizo, J. y Südhof T. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 15879-15882.
- Robinson, A.J., Richards, W.G., Thomas, P.J. y Hann, M.M. (1995) *Biophys. J.* **68**, 164-170.
- Roldan, E. R. S. y Fragio, C. (1994) *Biochem. J.* **297**, 225-232.
- Romanova, L.Y., Alexandrov, I.A., Schwab, G., Hilbert, D.M., Mushinski, J.F. y Nordan, R.P. (1996) *Biochemistry* **35**, 9900-9906.
- Romero, G., Thompson, K. y Biltonen, R.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 13476-13482.
- Ron, D. y Kazanietz, M.G. (1999) *FASEB J.* **13**, 1658-1676.
- Ron, D., Chen, C. H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. y Mochly-Rosen, D. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 839-843.

- Ron, D., Luo, J. y Mochly-Rosen, D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 24180-24187.
- Rothschild, K.J. y Clark, N.A. (1979) *Science* **204**, 311-312.
- Rozengurt, E., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J. y Valverde, A.M (1995) *Mutat. Res.* **333**, 153-160.
- Rytomaa, M., Mustonen, P. y Kinnunen, P.K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 22243-22248.
- Sadhale, Y. y Shah, J.C. (1999) *Int. J. Pharm.* **191**, 65-74.
- Saiki, R.K., Gelfan, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988) *Science* **239**, 487-491.
- Sakai, H., Sasaki, K., Ikegaki, N., Shirai, Y., Ono, Y. y Saito, N. (1997) *J. Cell Biol.* **139**, 1465-1476.
- Sakane, F., Kai, M., Wada, I., Imai, S. y Kanoh, H. (1996) *Biochem. J.* **318**, 583-590.
- Salari, H., Dryden, P., Davenport, R., Howard, S., Jones, K. y Bittman, R. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1134**, 81-88.
- Saleh, S.M., Takemoto, L.J., Zoukhri, D. y Takemoto, D.J. (2001) *Mol. Vis.* **7**, 240-246.
- Sánchez, P., De Carcer, G., Sandoval, I.V., Moscat, J. y Diaz-Meco, T (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 3069-3080.
- Sánchez-Migallón, M. P., Aranda, F. J. y Gómez-Fernández, J. C. (1995) *Biophys. J.* **68**, 558-566.
- Sánchez-Piñera, P., Aranda, F. J., Micol, V., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J. C. (1999b) *Biochim. Biophys. Acta* **1417**, 202-210.

- Sánchez-Piñera, P., Micol, V., Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J. C. (1999a) *Biochem. J.* **337**, 387-395.
- Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* **61**, 921-935.
- Sando, J. J. y Chertihin, O. I. (1996) *Biochem. J.* **317**, 583-588.
- Sardet, C., Counillon, L., Franchi, A. y Pouyssegur, J (1990) *Science* **247**, 723-726.
- Sauna, S., Yan, Z., Ohno, S. y Friedman, E. (1996) *Cell Growth Differ.* **7**, 587-594.
- Schaap, D., Hsuan, J., Totty, N. y Parker, P. J. (1990) *Eur. J. Biochem.* **191**, 431-435.
- Schiavo, G., Gu, Q.-M., Prestwich, G. D., Sollner, T. H. y Rothman, J. E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13327-13332.
- Schindler, H. y Seelig, J. (1975) *Biochemistry* **14**, 2283-2287.
- Schonwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J. y Parker, P.J. (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 790-798.
- Schwarz, D., Kisselev, P., Pfeil, W., Pisch, S., Bornscheuer, U. y Schmid, R. D. (1997) *Biochemistry* **36**, 14262-14270.
- Seddon, J.M. (1990a) *Biochemistry* **29**, 7997-8002.
- Seddon, J.M. (1990b) *Biochim. Biophys. Acta* **1031**, 1-69.
- Seeling, J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **515**, 105-140.
- Sekiguchi, K., Tsukuda, M., Ogita, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 797-802.
- Selbie, L. A., Schmitzpeiffer, C., Sheng, Y. H. y Biden, T. J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 24296-24302.

- Sen, A., Isac, T.V. y Hui, S.W. (1991) *Biochemistry* **30**, 4516-4521.
- Senisterra, G. y Epanand, R. M. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **300**, 378-383.
- Shah, J. y Shipley, G.G. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1119**, 19-26.
- Shannon, R. J., Fenerty, J. Hamilton, R. J. y Padley, F. B. (1992) *J. Sci. Food Agric.* **60**, 405-417.
- Shao, X., Davletov, B. A., Sutton, R. B., Südhof, T. C. y Rizo, J. (1996) *Science* **273**, 248-251.
- Shao, X., Fernandez, I., Südhof, T.C. y Rizo, J. (1998) *Biochemistry* **37**, 16106-16115.
- Shao, X., Li, C., Fernandez, I., Zhang, X., Südhof, T.C. y Rizo, J. (1997) *Neuron* **18**, 133-142.
- Sharkey, N. y Blumberg, P. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **133**, 1051-1056.
- Sheng, Z. H., Yokoyama, C. T. y Catterall, W. A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5405-5410.
- Shindo, M., Irie, K., Ohigashi, H., Kuriyama, M. y Saito, M. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 451-456.
- Shinomura, T., Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida, K. y Nishizuka, Y. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5149-5153.
- Shirai, Y., Kashiwagi, K., Yagi, K., Sakai, N. y Saito, N. (1998) *J. Cell Biol.* **143**, 511-521.
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M. y Takai, Y. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2061-2068.

- Shoji, M., Raynor, R., Berdel, W.E., Vogler, W.R. y Kuo, J.F. (1988) *Cancer Res.* **48**, 6669-6673.
- Shrake, A. y Ross, P.D. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7668-7677.
- Siegel, D.P. (1999) *Biophys. J.* **76**, 291-313
- Siegel, D. P., Banschbach, J., Alford, D., Ellens, H., Lis, L. J., Quinn, P. J., Yeagle, P. L., y Bentz, J. (1989) *Biochemistry* **28**, 3703-3709.
- Sigel, E. y Baur, R. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 6192-6196.
- Singer, S.J. y Nicholson, G.L. (1972) *Science* **175**, 720-731.
- Singleton, S.F. y Xiao, J. (2002) *Biopolymers* **61**, 145-158.
- Sklyarova, T., de Corte, V., Meerschaert, K., Devriendt, L., Vanloo, B., Bailey, J., Cook, L.J., Goethals, M., Van Damme, J., Puype, M., Vanderkerckhove, J. y Gettermans, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 39840-39849.
- Slater, S J., Cox, K. J. A., Lombardi, J. V., Ho, C., Kelly, M. B., Rubin, E. y Stubbs, C. D. (1993) *Nature* **364**, 82-84.
- Slater, S. J., Kelly, M. B., Taddeo, F. J., Ho, C., Rubin, E. y Stubbs, C. D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4866-4871.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. y Klenk, D. C. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Snoek, G. T., Feijen, A., Hage, W. J., van Rotterdam, W. y de Laat, S. W. (1988) *Biochem. J.* **255**, 629-637.
- Soderling, T.R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 1823-1826.

- Solodukhin, A. S., Caldwell, H.L., Sando, J.J., and Kretsinger, R.H. (2002) *Biophys. J.* **82**, 2700-2708.
- Soltoff, S. P. y Toker, A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 13490-13495.
- Song, J.S., Swann, P.G., Szallasi, Z., Blank, U., Blumberg, P.M. y Rivera, J. (1998) *Oncogen* **16**, 3357-3368.
- Sossin, W. S. y Schwartz, J. H. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 207-208.
- Souvignet, C., Pelosin, J.M., Daniel, S., Chambaz, E., Ransac, S. y Verger, R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 40-44.
- Spitzer, N.C., Lautermilch, N.J., Smith, R.D. y Gómez, T.M. (2000) *BioEssays* **22**, 811-817.
- Srinivasan, N., Bax, B., Blundell, T. L. y Parker, P. J. (1996) *Proteins* **26**, 217-235.
- Staudinger, J., Zhou, J., Burgess, R., Elledge, S.J. y Olson, E.N. (1995) *J. Cell Biol.* **128**, 263-271.
- Stebbins, E. G. y Mochy-Rosen, D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29644-29650.
- Stempka, L., Girod, A., Muller, H.J., Rincke, G., Marks, F., Gschwendt, M. y Bossemeyer, D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 6805-6811.
- Stephens, L. R., Jackson, T. R. y Hawkins, P. T. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1179**, 27-75.
- Stubbs, C. D. y Slater, S. J. (1996) *Chem. Phys. Lipids* **81**, 185-195.
- Surewicz, W.K., Leddy, J.J. y Mantsch, H.H. (1990) *Biochemistry* **29**, 8106-8111.
- Surewicz, W.K., Mantsch, H.H. y Chapman, D. (1990) *Biochemistry* **32**, 389-394.

- Susi, H. (1972) *Methods Enzymol.* **26**, 455-472.
- Susi, H., y Byler, D.M. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 465-469.
- Susi, H., Timasheff, S.N. y Stevens, L. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 5460-5466.
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Südhof, T. C. y Sprang, S. R. (1995) *Cell* **80**, 929-938.
- Sutton, R. B., Ernst, J. A. y Brunger, A. T. (1999) *J. Cell. Biol.* **147**, 589-598.
- Sutton, R. B. y Sprang, S. R. (1998) *Structure* **6**, 1395-1405.
- Swairjo, M.A., Concha, N.O., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. y Seaton, B.A. (1995) *Nat. Struct. Biol.* **2**, 968-974.
- Szallasi, Z., Bogi, K., Gohari, S., Biro, T., Acs, P. y Blumberg, P. M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18299-18301.
- Takahashi, K. y Fukada, H. (1985) *Biochemistry* **24**, 297-300.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, W., Kawahara, Y., Mori, T. y Nishizuka, Y. (1979) *J.Biol.Chem.* **254**, 3692-3695.
- Tamm, L.K. y Tatulian, S.A. (1997) *Q. Rev. Biophys.* **30**, 365-429.
- Tanaka, M. y Herr, W. (1990) *Cell* **60**, 375-386.
- Tanaka, S., Tominaga, M., Yasuda, I., Kishimoto, A. y Nishizuka, Y. (1991) *FEBS Lett.* **294**, 267-270.
- Tapley, P.M. y Murray, A.W. (1985) *Eur. J. Biochem.* **151**, 419-423.
- Taylor, S. S., Buechler, J. A. y Yonemoto, W. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 971-1005.

- Taylor, S.S. y Radzio-Andzelm, E. (1994) *Structure* **2**, 345-355.
- Testori, A., Hii, C., Fournier, A., Burgoyne, L. y Murray, A. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**, 222-227.
- Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A.C. y Aderem, A.A. (1991) *Nature* **351**, 320-322.
- Toker, A. (1998) *Front. Biosci.* **3**, D1134-D1147.
- Torrecillas, A., Corbalán-García, S., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J.C. (2001) *Biochemistry* **40**, 15038-15046.
- Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G. A., Ladner, M., Long, C. M., Crosier, W. J., Watt, K., Kohts, K. y McCormick, F. (1988) *Science* **242**, 1697-1700.
- Treisman, R. (1996) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 205-215.
- Tsutakawa, S. E., Medzihradsky, K. F., Flint, A. J., Burlingame, A. L. y Koshland Jr., D. E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 26807-26812.
- Ubach, J., García, J., Nittler, MP, Südhof, T.C. y Rizo, J. (1999) *Nat. Cell Biol.* **1**, 106-112.
- Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T. C. y Rizo, J. (1998) *EMBO J.* **17**, 3921-3930.
- Überall, F., Giselbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H.H. y Baierm G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4072-4078.
- Überall, F., Oberhuber, H., Maly, K., Zaknun, J., Demuth, L. y Grunicke, H.H. (1991) *Cancer Res.* **51**, 807-812.
- Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K. y Ohno, S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 23512-23519.

- Valverde, A. M., Sinnott-Smith, J., Van Lint, J. y Rozengurt, E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 85725-8576.
- Van Gorkom, L. C. M., Nie, S. Q. y Epand, R. M. (1992) *Biochemistry* **31**, 671-677.
- Verdaguer, N., Corbalán-García, S., Ochoa, W. F., Fita, I. y Gómez-Fernández, J. C. (1999) *EMBO J.* **18**, 6329-6338.
- Vergères, G., Manenti, S., Weber, T. y Stürzinger, C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19879-19887.
- Vigh, L., Maresca, B. y Harwood, J.L. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 369-374.
- Villalain, J. y Gómez-Fernández, J.C. (1992) *Biochem Soc Trans.* **20**, 122S.
- Villar, A. V., Gofí, F. M. y Alonso, A. (2001) *FEBS Letters* **494**, 117-120.
- Vogler, W.R., Olson, A.C., Okamoto, S., Shoji, M., Raynor, R.L., Kuo, J.F., Berdel, W.E., Eibl, H., Hadju, J. y Nomura, H. (1991) *Lipids* **26**, 1418-1423.
- Volkman, A., Barthlott, T., Weiss, S., Frank, R. y Stokinger, B. (1998) *J. Exp. Med.* **188**, 1083-1089.
- Wakasaki, H., Koya, D., Schoen, F.J., Jirousek, M.R., Ways, D.K., Hoyt, B.D., Walsh, R.A. y King, G.L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9320-9325.
- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L. y Williams, R.L. (1999) *Nature* **402**, 313-320.
- Walker, J.M. y Sando, J.J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4537-4540.
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. y Südhof, T.C. (1997) *Nature* **388**, 593-598.

- Watanabe, G., Saito, Y., Madaule, P., Ishizaki, T., Fujisawa, K., Morii, N., Mukai, H., Ono, Y., Kakizuka, A. y Narumiya, S. (1996) *Science* **271**, 645-648.
- Ways, D.K., Kukoly, C.A., de Vente, J., Hooker, J.L., Bryant, W.O., Posekany, K.J., Fletcher, D.J., Cook, P.P. y Parker, P.J. (1995) *J. Clin. Invest.* **95**, 1906-1915.
- West, C.M. (1986) *Mol. Cell Biochem.* **72**, 3-20.
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Cheng, V.C. y Axel, R. (1977) *Cell* **11**, 223-227.
- Wiseman, T., Willinston, S., Brandts, J.F. y Lin, L.N. (1989) *Anal. Biochem.* **179**, 131-137.
- Wong, P.T.T. y Mantsch, H.H. (1988) *Chem. Phys. Lipids* **46**, 213-224.
- Woodget, J.R., Hunter, T y Gould, K.L. (1987) Plenum Press, New York **3**, 215-340.
- Xiao, B., Smerdon, S.J., Lones, D.H., Dogson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A. y Garbblin, S.J. (1995) *Nature (London)* **376**, 188-191.
- Xu, G.Y., McDonagh, T., Yu, H.A., Nalefski, E.A., Clark, J.D. y Cumming, D.A. (1998) *J. Mol. Biol.* **280**, 485-500.
- Xu, R.X., Pawelczyk, T., Xia, T. y Brown, S.C. (1997) *Biochemistry* **36**, 10709-10717.
- Yamamoto, T., Matsui, T., Nakafuku, M., Iwamatsu, A. y Kaibuchi, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30557-30561.
- Yang, L. y Glaser, M. (1995) *Biochemistry* **34**, 1500-1506.
- Yazaki, T., Ahmad, S., Chahlavi, A., Zylber-Katz, E., Dean, N.M., Rabkin, S.D., Martuza, R.L. y Glazer, R.I. (1996) *Mol. Pharmacol.* **50**, 236-242.

- Zhang, G., Kazanietz, M. G., Blumberg, P. M. y Hurley, J. H. (1995) *Cell* **81**, 917-924.
- Zhang, H., Ishikawa, Y, Yamamoto, Y. y Carpentier, R. (1998) *FEBS Lett.* **426**, 347-351.
- Zhang, J. Z., Davletov, B. A., Südhof, T. C. y Anderson, R. G. W. (1994) *Cell* **78**, 751-760.
- Zhang, Z.H., Johnson, J.A., Chen, L., El-Sherif, N., Mochly-Rosen, D. y Boutjdir, M. (1997) *Circ. Res.* **80**, 720-729.
- Zheng, B., Oisi, K., Shoji, M., Eibl, H., Berdel, W.E., Hajdu, J., Vogler, W.R. y Kuo, J.F. (1990) *Cancer Res.* **50**, 3025-3031.
- Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M. y Wang, X. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 19700-19706.
- Zhuo, J.L., Iming, J.D., Hammond, T.G., Orengo, S., Benes, E. y Navar, L.G. (2002) *Hypertension* **39**, 116-121.
- Zidovetzki, R. (1997) *Curr. Topics Membr.* **44**, 255-283.
- Zidovetzki, R., Blatt, Y., Schepers, G. y Petch, I. (1988) *Mol. Immunol.* **25**, 379-383.
- Zidovetzki, R. y Lester, D.S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1134**, 261-272.
- Zidovetzki, R., Laptalo, L. y Crawford, J. (1992) *Biochemistry* **31**, 7683-7691.