

UNIVERSIDAD DE MURCIA



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

**ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y
FUNCIÓN DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS
QUINASAS C**

Por

SONIA SÁNCHEZ BAUTISTA

MEMORIA

**Presentada para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas**

Murcia, Mayo 2007

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARN_m	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
C2-PKC	Dominio C2 de PKC
CBR	Región de unión de calcio
C_p	Capacidad calorífica
cpm	Cuentas por millón
DAG	Diacilglicerol
DAPS	1,2-Acetil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina
DCPA	1,2-Dicaproil- <i>sn</i> -ácido fosfatídico
DCPS	1,2-Dicaproil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina
DEPE	1,2-Dielaidil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
DGTS	Detector de sulfato de triglicina deuterado
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
d-PE	Dansil-fosfatidiletanolamina
D.O.	Densidad óptica
DOC2	Proteína con doble dominio C2
DOG	1,2- <i>sn</i> -dioleilglicerol
DPG	1,2- <i>sn</i> -Dipalmitilglicerol
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTT	Ditiotreitol
D₂O	Agua deuterada
EDTA	Ácido etilenodinitrilotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
FT-IR	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
GAP	Proteínas que activan a la GTPasa
GST	Glutación S-transferasa
H	Coeficiente de Hill
HA	Hemaglutinina
Hepes	N-(2-Hidroxietil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico)
H₂O	Agua

Ins(3,4,5)P₃	Inositol 3,4,5-trisfosfato
IPTG	Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
JNK	Quinasa N-terminal de JUN
K_D	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
KSR	Quinasa supresora de ras
L	Ligando
LB	Medio Luria-Bertani
LUV	Vesículas unilamelares grandes
M	Macromolécula
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MARCKS	Sustrato de PKC rico en alaninas miristoladas
MCT	Detector de mercurio-cadmio-telurio
MEK	Quinasa activada por mitógenos
MLV	Vesículas multilamelares
MOPS	Ácido 3-(morfolino)propanosulfónico
n	Número de sitios de unión
OG-dPE	Oregon Green® 488-dansil fosfatidiletanolamina
PA	Ácido fosfatídico
PAF	Factor de activación plaquetaria
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
POPC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDBu	Forbol 12,13-dibutirato
PDK	Quinasa dependiente de fosfoinositoles
PH	Dominio homólogo a pleckstrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMA	Forbol 12-miristato-13-acetato

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POPG	1-Palmitil-2-oleil-fosfoglicerol
POPA	1-Palmitil-2-oleil- <i>sn</i> -ácido fosfatídico
POPC	1-Palmitil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
POPS	1-Palmitil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina
ppm	Partes por millón
PS	Fosfatidilserina
PSA	Persulfato amónico
PtdIns	Fosfatidilinositol
PtdIns(3)P	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PtdIns(4,5)P₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PtdIns(3,4,5)P₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
PTEN	Proteína fosfatasa de tirosina
RACK	Receptor para la PKC activada
ras-GRP	Proteínas ras liberadoras de guanilo
RICK	Receptor para la PKC inactivada
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SAG	1,2- <i>sn</i> -estearil-araquidonilglicerol
SDS	Dodecil-sulfato sódico
SH	Dominio homólogo a Src
SOC	Medio de cultivo SOC
STICK	Sustratos que interaccionan con PKC
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
T_c	Temperatura crítica de la transición de fase
OG-dPE	Oregon green®- dansil-fosfatidiletanolamina
TE	Tampón Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
TKR	Receptor con actividad tirosina quinasa
T_m	Temperatura media de la transición
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
2D-IR	Correlación bidimensional de la espectroscopía de infrarrojo
ΔC_p	Incremento en la capacidad calorífica
ΔG	Incremento de la energía libre de Gibbs
ΔH	Incremento de entalpía

ΔS	Incremento de entropía
δ	Desplazamiento químico
(p/v)	Relación peso/volumen
(v/v)	Relación volumen/volumen

ABREVIATURAS

CAPÍTULO I. Introducción y Objetivos.

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Introducción a la proteína quinasa C (PKC)	3
1.2 Insoenzimas de la PKC	5
1.3 Regiones conservadas de la región reguladora	7
1.3.1 Dominio pseudosustrato	7
1.3.2 Dominio C1	9
1.3.2.1 Estructura	9
1.3.2.2 Función y regulación: unión a DAG y a ésteres forbol de forbol	12
1.3.2.3 Unión a otros lípidos diferentes de DAG/ésteres de forbol	14
1.3.2.4 El dominio C1 se encuentra en otras proteínas distintas de la PKC	15
1.3.3 Dominio C2	16
1.3.3.1 Estructura	16
1.3.3.2 Función y regulación	19
1.3.3.3 Dominio C2 de las PKC clásicas	24
1.3.3.3.1 Región de unión de calcio y a fosfolípidos como fosfatidilserina	25
1.3.3.3.2 Región rica en lisinas	29
1.3.3.4 Dominio C2 de las PKC nuevas	33
1.3.3.5 El dominio C2 se encuentra en otras proteínas diferentes de la PKC	37
1.3.3.6 Interacciones intramoleculares entre los dominios C1 y C2 de las PKCs	38
1.4 Regiones conservadas de la región catalítica	40
1.4.1 Dominio catalítico	40

1.5	Regiones variables	49
1.6	Regulación de la PKC	51
1.6.1	Regulación por las propiedades de la membrana	51
1.6.2	Regulación por interacción con otras proteínas	52
1.7	Activación de la PKC	55
1.7.1	Rutas de activación	55
1.7.2	Modelo de activación	57
1.8	Funciones de la PKC	59
2.	OBJETIVOS.	63

CAPÍTULO II. Métodos y Técnicas Generales.

1.	MÉTODOS	67
1.1	Obtención de los dominios C2 de la PKC α y PKC ϵ	67
1.1.1	Construcción de los plásmidos de expresión	67
1.1.1.1	Amplificación mediante la técnica de PCR y digestión de los fragmentos de ADN de los dominios C2 de la PKC α y PKC ϵ	67
1.1.1.2	Corte del vector de expresión	68
1.1.1.3	Ligación del vector de expresión y el fragmento de ADN	69
1.1.1.4	Selección de los plásmidos que han incorporado el fragmento de ADN	69
1.1.2	Expresión y purificación de los dominios 6xHis-C2 de la PKC α y PKC ϵ	72
1.2	Obtención del dominio catalítico de la PKC ζ	74
1.2.1	Construcción del baculovirus recombinante	74
1.2.1.1	Inserción del gen del dominio catalítico de la PKC ζ en el vector de expresión	76
1.2.1.2	Transposición del ADN plasmídico recombinante	77
1.2.1.3	Aislamiento del plásmido de ADN recombinante	78

1.2.1.4	Transfección de las células de insecto <i>sf9</i>	79
1.2.2	Cultivo de células de insecto <i>sf9</i>	81
1.2.3	Purificación del dominio catalítico de la PKC ζ	81
1.3	Obtención de los dominios C1B de las isoenzimas de la PKC α , PKC γ , PKC δ y PKC ϵ	84
1.3.1	Construcción de los plásmidos de expresión	84
1.3.1.1	Amplificación mediante PCR y digestión de los fragmentos de ADN correspondientes a cada uno de los dominio C1	84
1.3.1.2	Corte del vector de expresión	85
1.3.2	Expresión de los dominios C1B en células de mamífero HEK293	86
1.3.2.1	Cultivo de células de mamífero HEK293	86
1.3.2.2	Transfección de las células por precipitación de fosfato cálcico	86
1.3.2.3	Obtención del lisado celular que contiene los diferentes dominios C1	87
1.4	Determinación de la concentración de proteína	88
1.5	Electroforesis	88
1.6	Tinción de los geles de electroforesis	89
1.6.1	Tinción de plata	89
1.6.2	Tinción con azul Coomassie	89
1.7	Determinación de la concentración de lípidos	90
1.7.1	Determinación de la concentración de fosfolípido	90
1.7.2	Determinación de la concentración de diacilglicerol	90
1.8	Preparación de vesículas fosfolipídicas	91
1.8.1	Vesículas multilamelares (MLV)	91
1.8.2	Vesículas unilamelares pequeñas (SUV)	91
2.	TÉCNICAS GENERALES	92
2.1	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	92
2.2	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	96
2.2.1	Calorimetría diferencial de barrido de lípidos	98

2.3	Espectroscopía de fluorescencia	99
2.3.1	Fluorescencia intrínseca	103
2.3.2	Transferencia de resonancia de fluorescencia (FRET)	104
2.4	Resonancia magnética nuclear	109
2.4.1	Rotación a alta velocidad en el ángulo mágico (MAS)	111
2.5	Espectroscopía de infrarrojo	113
2.5.1	Grupos vibracionales de los fosfolípidos	115
2.5.1.1	Cadenas hidrocarbурadas	115
2.5.1.2	Región interfacial	116
2.5.1.3	Cabeza polar	116
2.5.2	Modos vibracionales en péptidos y proteínas	117
2.5.2.1	Obtención de los espectros de infrarrojo y tratamiento de los datos	121
2.5.2.2	Obtención del porcentaje de intercambio H-D	125
2.5.2.3	Espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional 2D-IR	125
2.5.2.3.1	Espectroscopía bidimensional basada en una perturbación	126
2.5.2.3.2	Análisis de correlación bidimensional	127
2.5.2.3.3	Propiedades de los espectros de correlación bidimensional	131

CAPÍTULO III. Activación de la PKC α mediante PtdIns(4,5)P $_2$.

1. RESUMEN	137
2. INTRODUCCIÓN	138
3. RESULTADOS	141
3.1 Análisis de ITC	141
3.1.1 Unión del dominio C2 de la PKC α a PtdIns(4,5)P $_2$ en presencia y ausencia de calcio	141

3.1.2	Papel de la <i>región de unión de calcio</i> en la interacción C2 α -PtdIns(4,5)P ₂	144
3.1.3	Papel de la <i>región rica en lisinas</i> en la interacción C2 α -PtdIns(4,5)P ₂	146
3.1.4	Valoración de la unión de calcio	147
3.2	Análisis de FRET	149
3.2.1	Valoración de la sustitución de varios aminoácidos en la afinidad de unión a PtdIns(4,5)P ₂ en presencia y ausencia de calcio mediante FRET	149
3.2.1.1.	<i>Región rica en lisinas</i>	149
3.2.1.2.	<i>Región de unión de calcio</i>	152
3.2.2	Afinidad de unión del dominio C2 de la PKC α a otros fosfoinosítidos distintos del PtdIns(4,5)P ₂	153
3.2.3	Afinidad de unión a membranas biológicas compuestas por POPS y PtdIns(4,5)P ₂	155
4.	DISCUSIÓN	157
4.1	El dominio C2 de la PKC α se une con mayor afinidad a PtdIns(4,5)P ₂ en presencia de Ca ²⁺	157
4.2	La <i>región de unión de calcio</i> y la <i>región rica en lisinas</i> cooperan en la unión del dominio C2 α -PtdIns(4,5)P ₂	157
4.3	El dominio C2 de la PKC α presenta mayor afinidad por PtdIns(4,5)P ₂ que por otros fosfolípidos negativos	159
 CAPÍTULO IV. Interacción del dominio C2 de la PKCϵ con membranas modelo.		
1.	RESUMEN	165
2.	INTRODUCCIÓN	166
3.	RESULTADOS	168

3.1	Efecto del dominio C2 de la PKC ϵ en la temperatura de transición de diferentes mezclas lipídicas	168
3.2	Espectroscopía de ^{31}P -RMN MAS	170
3.2.1	^{31}P -RMN MAS del POPA en ausencia o presencia del dominio C2 ϵ	170
3.2.2	^{31}P -RMN MAS de diferentes mezclas POPC/POPA en ausencia y presencia del dominio C2 ϵ	172
3.2.3	Tiempos de relajación ^{31}P -RMN MAS	177
3.3	Espectroscopía de infrarrojo	180
4.	DISCUSIÓN	183

CAPÍTULO V. Interacción de los dominios C1 a lípidos negativos y DAGs.

1.	RESUMEN	191
2.	INTRODUCCIÓN	192
3.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	195

CAPÍTULO VI. Análisis de la estructura secundaria del dominio catalítico-PKC ζ .

1.	RESUMEN	215
2.	INTRODUCCIÓN	216
3.	RESULTADOS	218
3.1	Estudio de la estructura secundaria del dominio Cat- ζ mediante FT-IR	218
3.1.1	Estructura secundaria de Cat- ζ en ausencia de ligando a 25 °C: H ₂ O y D ₂ O	218

3.1.2 Estructura secundaria de Cat- ζ en presencia de Mg ²⁺ -ATP	224
3.1.2.1 Estructura secundaria de Cat- ζ en presencia de Mg ²⁺ -ATP y a 25 °C	224
3.1.2.2 Estructura secundaria de Cat- ζ en presencia y ausencia de Mg ²⁺ -ATP a 80 °C	225
3.1.3 Estabilidad térmica del dominio catalítico Cat- ζ	228
3.2 Estudios de espectroscopía de infrarrojo de correlación bidimensional	229
3.2.1 Correlación bidimensional síncrona	229
3.2.2 Correlación bidimensional asíncrona	231
4. DISCUSIÓN	233
 CAPÍTULO VII. Discusión General y Conclusiones.	
1. DISCUSIÓN GENERAL	241
2. CONCLUSIONES	248
BIBLIOGRAFÍA	253

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. INTRODUCCIÓN A LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC).

La Proteína Quinasa C (PKC) fue una de las primeras proteínas quinasas identificadas. Paulatinamente, se fueron incorporando más datos a la descripción y se descubrió que también podía ser activada por fosfatidilserina, diacilglicerol y ésteres de forbol como PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) de una forma dependiente de Ca^{2+} (Nishizuka, 1984; Blumberg y col., 1988).

Actualmente con el nombre genérico de la PKC, se engloba a una familia de quinasas que fosforilan a otras proteínas en residuos de Ser y Thr y que en mamíferos está constituida por 10 isoenzimas diferenciadas fundamentalmente en la región reguladora. Las distintas isoenzimas presentan una distribución característica en los tejidos, se activan en respuesta a distintos metabolitos lipídicos, interaccionan con diferentes proteínas y fosforilan sustratos distintos (Hug y Sarre, 1993; Johannes y col., 1994; Jaken, 1996; Hofmann, 1997).

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 (Ins-1,4,5-P_3) (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 interactúan 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 (diacilglicerol, 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 Kazanietz 1999; Dempsey y col., 2000; Newton, 2001).

Debido a la cantidad de cuestiones que quedan por esclarecer en una enzima implicada en procesos celulares tan importantes, hacen que la PKC y en concreto, sus dominios de la región reguladora, sean uno de los campos más desarrollados en la actualidad para el estudio del mecanismo de activación de estas enzimas.

1.2. ISOENZIMAS DE LA PKC.

Atendiendo a su estructura primaria y al requerimiento de distintos cofactores para la regulación de su actividad enzimática, las 10 isoenzimas que componen la Familia de las PKC se clasifican en tres grandes subfamilias (Figura I.1):

PKC clásicas o convencionales (PKCc): está formada por las isoenzimas α , β I, β II y γ (Inoue y col., 1977; Coussens y col., 1986). Las dos isoformas distintas que presenta la PKC β son debidas a un procesamiento alternativo del ARN a partir de un mismo gen, presentando dos productos génicos (β I y β II) que sólo se diferencian en su extremo carboxilo terminal (Ono y col., 1987b).

PKC nuevas (PKCn): en esta subfamilia se agrupan las isoenzimas ϵ , δ (Ono y col., 1987a), η (Osada y col., 1990) y θ (Osada y col., 1992).

PKC atípicas (PKCa): es una subfamilia compuesta por dos miembros, la PKC ζ y la PKC ι/λ (PKC ι (isoforma en humano) (Selbie y col., 1993)/ PKC λ (isoforma en ratón) (Akimoto y col., 1994).

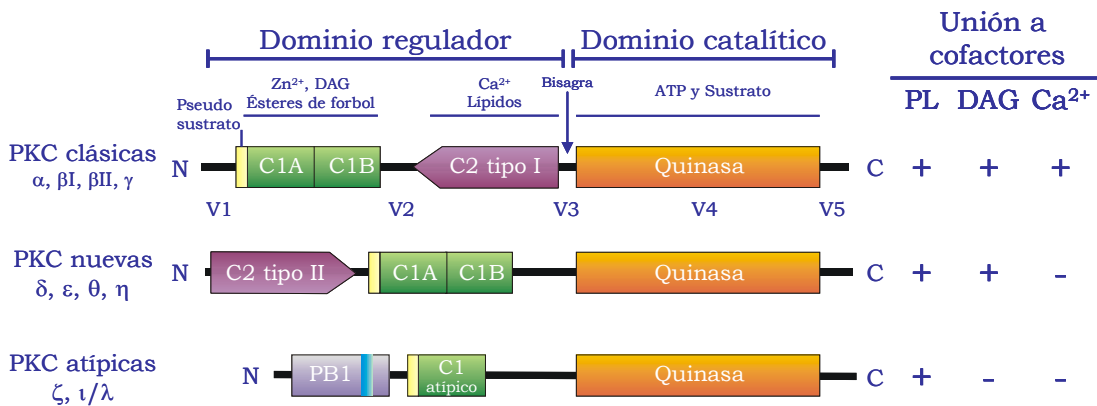


Figura I.1. Representación esquemática de la estructura primaria de las isoenzimas de la PKC. Se muestran los distintos dominios que la forman, así como los requerimientos de cofactores para su regulación. El extremo amino terminal contiene la región reguladora con el dominio pseudosustrato, el dominio C1 de unión a DAG y ésteres de forbol y el dominio C2 de unión a fosfolípidos aniónicos. El extremo carboxilo terminal contiene la región catalítica de la enzima con el dominio quinasa de unión a ATP y al sustrato.

Los requerimientos de cofactores para la activación de las distintas isoenzimas difieren en función de cada subfamilia (Figura

I.1). Así, el grupo de las PKCc requiere de fosfolípidos cargados negativamente, DAG o ésteres de forbol, y calcio. El grupo de las PKCn 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 PKCa sólo requiere de la presencia de fosfolípidos cargados negativamente para su activación (Kitagawa y col., 1991; Nishizuka y col., 1995; Mellor y Parker, 1998; Newton y Johnson, 1998; Newton, 2001).

Desde el punto de vista estructural, todas las isoenzimas constan de 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 región bisagra (Newton, 1993). En todas las subfamilias, las principales diferencias residen en la región reguladora estando muy conservada la región catalítica (Figura I.1).

Dentro de las *PKC clásicas (PKCc)* se pueden distinguir tres dominios conservados (C1, C2 y el dominio catalítico) y cinco regiones variables (V1, V2, V3, V4 y V5) (Coussens y col., 1986). La región reguladora incluye la secuencia pseudosustrato y los dominios C1 y C2 mientras que la región catalítica contiene el dominio quinasa o también denominado dominio catalítico. La secuencia pseudosustrato es capaz de bloquear el sitio activo presente en el dominio catalítico inhibiendo así la actividad enzimática (House y Kemp, 1987). El dominio C1 posee una región rica en residuos de Cys y aparece duplicado en tandem (C1A y C1B), siendo el responsable de la unión al diacilglicerol y a los ésteres de forbol (Bell y Burns, 1991). El dominio C2 en esta subfamilia es de tipo I y contiene los sitios de enlace para fosfolípidos ácidos y para los iones Ca^{2+} (Corbalán-García y col., 1998; Medkova y Cho, 1998a; Verdaguer y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2000). Por otro lado, la región catalítica contiene los sitios de unión para el ATP y para el sustrato susceptible de fosforilación por la PKC (Hanks y col., 1988; Kemp y Pearson, 1990).

Las *PKC nuevas (PKCn)* son muy similares estructuralmente a las PKCc. Contienen dos dominios C1 en tandem pero a diferencia de las isoenzimas clásicas, tienen un dominio C2 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 unión para el Ca^{2+} (García-García y col., 2001; Ochoa y col., 2001).

Por otro lado, las *PKC atípicas (PKCa)* sólo poseen un dominio C1 y por ello se denomina atípico (Ono y col., 1987a) y no contienen dominio C2. Además, y a diferencia de las otras isoenzimas, las PKCa poseen un dominio peculiar denominado dominio PB1. Este dominio se encuentra localizado en extremo amino terminal, consta de 85 aminoácidos y se caracteriza porque se une a otras proteínas que contienen dominios PB1 tales como Zip/p62, Par6 o MAPK5 a través de la interacción entre los dominios PB1 (Moscat y Díaz-Meco, 2000; Díaz-Meco y Moscat, 2001; Ohno y Nishizuka, 2002; Ponting y col., 2002; Moscat y col., 2006). Todas estas diferencias estructurales en la región reguladora permiten entender por qué las PKCa son insensibles a los activadores de las otras isoenzimas, como son el Ca^{2+} , diacilglicerol y los ésteres de forbol (Nishizuka, 1995).

1.3. REGIONES CONSERVADAS DE LA REGIÓN REGULADORA.

1.3.1. Dominio Pseudosustrato.

El dominio pseudosustrato, también denominado autoinhibitorio, se encuentra en todas las isoenzimas de la PKC. Está constituido por una pequeña secuencia consenso de 20 aminoácidos de carácter básico situada en el extremo amino terminal de la región reguladora de la enzima (House y Kemp, 1987).

La secuencia del dominio se encuentra ampliamente conservado en todas las isoenzimas de la PKC y guarda similitud con los sustratos susceptibles de ser fosforilados por la PKC de ahí su denominación. La diferencia reside principalmente a que en la posición donde se encuentran los residuos de Ser o Thr susceptibles de fosforilación por la enzima, en la región pseudosustrato aparece un residuo de Ala ([Figura I.2](#)) (House y Kemp, 1987; Nishikawa y col., 1997). De hecho, mutaciones en los residuos de Ser o Thr a Ala en las secuencias de reconocimiento de los diferentes sustratos de la PKC producen el mismo efecto inhibitorio que el dominio pseudosustrato (Pears y col., 1990).

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 y para que se produzca la activación de la enzima es necesario que tenga lugar el desplazamiento del dominio pseudosustrato del sitio activo (Orr y col., 1992) (Figura I.3).

		Posición												
Isoenzimas PKC		-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5
PKCα	<i>Sustrato óptimo</i>	R	R	R	R	R	K	G	S	F	R	R	K	A
	<i>Pseudosustrato</i>	N	R	F	A	R	K	G	A	L	R	Q	K	N
PKCβI	<i>Sustrato óptimo</i>	F	K	L	K	R	K	G	S	F	K	K	F	A
	<i>Pseudosustrato</i>	V	R	F	A	R	K	G	A	L	R	Q	K	N
PKCβII	<i>Sustrato óptimo</i>	Y	K	L	K	R	K	G	S	F	K	K	K	A
	<i>Pseudosustrato</i>	V	R	F	A	R	K	G	A	L	R	Q	K	N
PKCγ	<i>Sustrato óptimo</i>	R	R	R	R	R	K	G	S	F	K	R	K	A
	<i>Pseudosustrato</i>	P	L	F	C	R	K	G	A	L	R	Q	K	V
PKCδ	<i>Sustrato óptimo</i>	A	R	R	K	R	K	G	S	F	F	Y	G	G
	<i>Pseudosustrato</i>	P	T	M	N	R	R	G	A	I	K	Q	A	K
PKCϵ	<i>Sustrato óptimo</i>	Y	Y	X	K	R	K	M	S	F	F	E	F	F
	<i>Pseudosustrato</i>	R	P	R	K	R	Q	G	A	V	R	R	R	V
PKCη	<i>Sustrato óptimo</i>	A	R	R	R	R	R	R	S	F	R	R	X	R
	<i>Pseudosustrato</i>	F	T	R	K	R	Q	R	A	M	R	R	R	V
PKCζ	<i>Sustrato óptimo</i>	R	R	F	K	R	Q	G	S	F	F	Y	F	F
	<i>Pseudosustrato</i>	K	S	I	Y	R	R	G	A	R	R	W	R	K

Figura I.2. 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 (α , β I, β II y γ), nuevas (δ , ϵ y η) y atípica (ζ), junto con las secuencias de los sustratos óptimos para las mismas isoenzimas. El residuo fosfoaceptor aparece en negrita en la posición 0. En recuadros aparecen las regiones en común que mantienen entre sí el sustrato óptimo y el pseudosustrato. Tomado de Nishikawa y col. (1997).

Existe una cierta controversia respecto al modo y momento en el que el pseudosustrato debe ser liberado del sitio catalítico para que tenga lugar la activación de la enzima. Algunos autores sostienen que la salida del pseudosustrato se produce tras el enlace del dominio C2 a la membrana (Oancea y Meyer, 1998) mientras que otros autores sugieren que es necesaria la interacción de ambos dominios, C1 y C2, con la membrana para que el pseudosustrato se libere del sitio catalítico de la PKC (Newton, 1995; Ron y Kazanietz, 1999; Johnson y col., 2000; Slater y col., 2002). 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. Por otro lado, Leventhal y Bertics (1993) demostraron que la liberación del pseudosustrato del sitio activo de la PKC puede producirse también por la unión a la proteína de ciertos péptidos ricos en residuos de Arg.

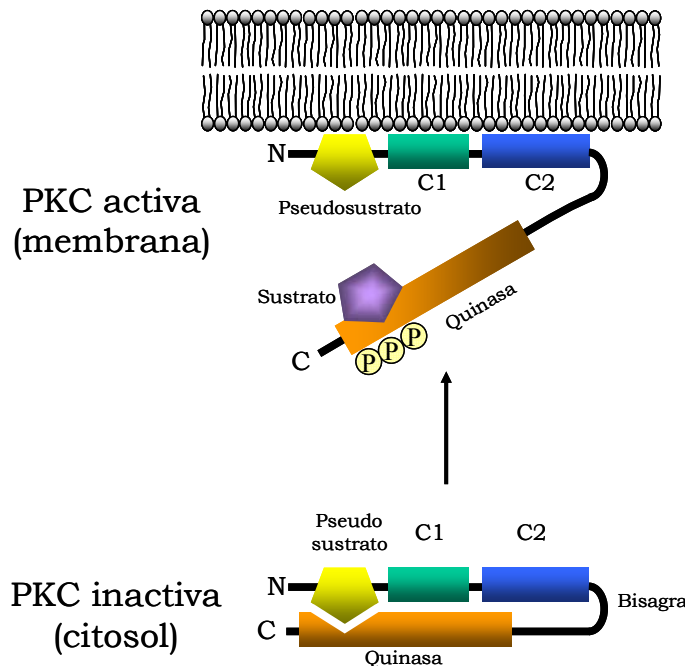


Figura I.3. Representación esquemática de la posición del pseudosustrato en la PKC. En la conformación inactiva de la enzima, el pseudosustrato bloquea el sitio catalítico de la PKC. Una vez que la enzima está fosforilada y se ha unido a la membrana mediante la interacción con diversos efectores lipídicos, a través de su región reguladora (dominios C1 y C2), el pseudosustrato se libera de la región catalítica y queda accesible para el sustrato adoptando así su conformación activa.

1.3.2. Dominio C1.

1.3.2.1. Estructura.

El dominio C1 está presente en la región reguladora de todas las isoenzimas de la PKC y es necesario para la activación de las PKCc y PKCn, por ser el encargado de unirse a DAG (1,2-*sn*-diacilglicerol) y a ésteres de forbol (Ono y col., 1989a; Bell y Burns; 1991, Kazanietz y col., 1994; Quest y Bell, 1994; Bittova y col., 2001). Sin embargo, en las PKCa, el dominio C1 no se une a dichos compuestos y se desconoce la función que desempeña (Ono y col.,

1989b; Akimoto y col., 1994; Mott y col., 1996; Mellor y Parker, 1998; Wakelam, 1998).

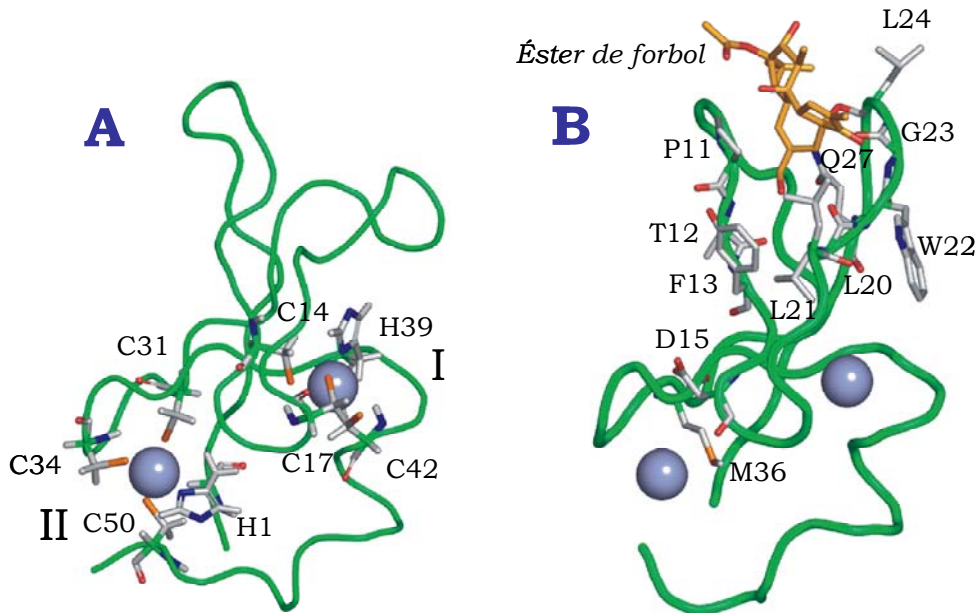


Figura I.4. Modelos estructurales de los dominios C1B de la PKC γ (A) y de la PKC δ (B) unido a PMA. (A) Estructura general del dominio C1B de la PKC γ donde los átomos de zinc aparecen representados a modo de esferas de color azul y los residuos de histidina y cisteína implicados en la coordinación de los iones zinc aparecen en modelo de barras. (B) Estructura general del dominio C1B de la PKC δ unida a la molécula de éster de forbol PMA (12-miristato-13-acetato forbol) que aparece representada en color naranja donde también se resaltan los residuos del dominio C1 que interaccionan con dicho compuesto. Tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, (2006).

Secuencialmente, el dominio C1 consta de unos 50 aminoácidos donde los residuos de Cys, son especialmente abundantes. En las PKC c y PKC n , dicha secuencia aparece duplicada en tandem y a los motivos repetidos se les denomina C1A y C1B, en orden de proximidad al extremo amino terminal de la cadena. Estos dominios C1 presentes en las PKC c y PKC n , se conocen como dominios C1 típicos. En el caso de las PKC a , solamente figura una copia de la secuencia y se les denomina, dominios C1 atípicos (Mellor y Parker, 1998; Newton y Johnson, 1998).

En cada motivo C1 aparece una secuencia consenso de seis Cys y dos His (**HX₁₂CX₂CX_{13/14}CX₂CX₄H X₂CX₂CX₇C**), que es la responsable de la coordinación de dos iones Zn²⁺ (Hubbard y col., 1991; Quest y col., 1992). Es por ello que los dominios C1, también

son conocidos como motivos “en dedos de zinc” (Hubbard y col., 1991, Hurley y col., 1997).

La estructura tridimensional resultante de los estudios de RMN (resonancia magnética nuclear) y difracción de rayos X, muestran al dominio C1 de la PKC, como una estructura globular compuesta por dos hojas β antiparalelas, formadas por tres y dos cadenas y con una pequeña hélice α en el extremo carboxilo terminal. Al final de cada hoja β , aparece un átomo de zinc coordinado con los residuos conservados de His y Cys, que de este modo, estabilizan la estructura (Hommel y col., 1994; Zhang y col., 1995) (Figura I.4).

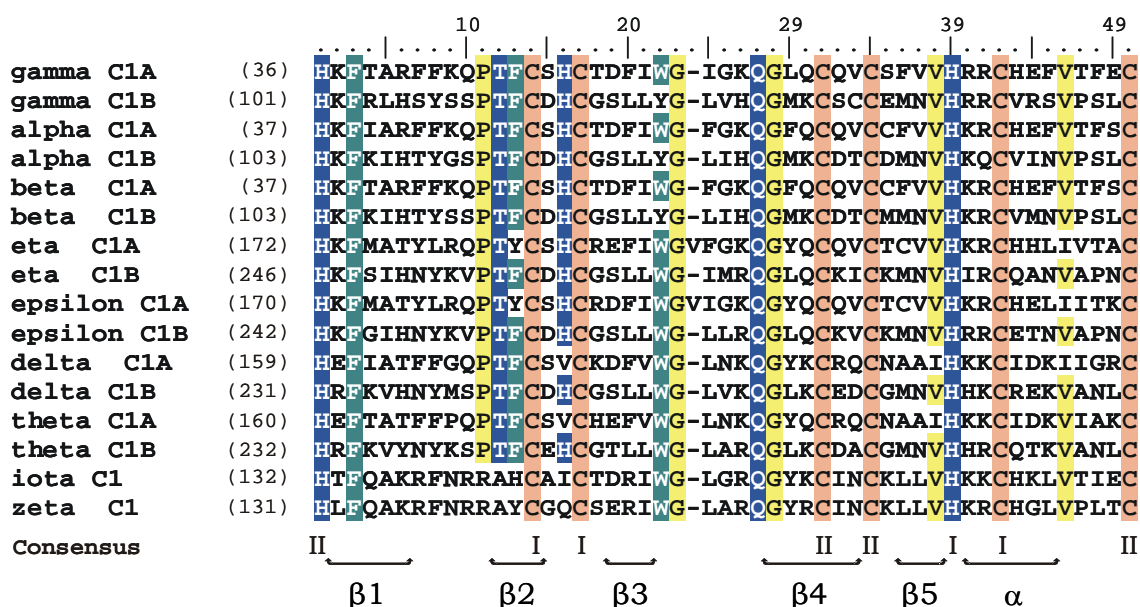


Figura I.5. Alineación de los dominios C1 de la familia de las PKC. Los residuos coloreados corresponden a aquellos que presentan más de un 70 % de homología. Los residuos de naturaleza aromática están marcados en verde, los residuos hidrofóbicos y los residuos de Gly se encuentran marcados en amarillo, los residuos polares en azul excepto las Cys que están marcadas en color rosa. Los números romanos I y II indican los residuos implicados en la coordinación de los dos iones Zn^{2+} . Los números en paréntesis corresponden a la posición del residuo de His en la izoenzima completa. Tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, (2006).

Los residuos implicados en la coordinación de los iones zinc son Cys14, Cys17, His39 y Cys42 para el sitio I, y Cys31, His 1, Cys34 y Cys50 para el sitio II. Los dos residuos de His involucrados se encuentran localizados en cavidades hidrofóbicas formadas por residuos de Leu21, Tyr22, Val 43 para el sitio I, y Phe3, Met36 y Val46 para el sitio II (Hommel y col., 1994) (Figuras I.4 y I.5)

1.3.2.2. *Función y regulación: unión a DAG y a ésteres de forbol.*

La unión de las PKCc y PKCn tanto a DAG como a los ésteres de forbol, es de carácter reversible. Estas proteínas, aunque presentan dos copias del dominio C1, se unen a ambos compuestos según una estequiometría 1:1 (Kikkawa y col., 1983; Köning y col. 1985; Hannun y col., 1986; Mosior y Newton, 1996). Esto ha sugerido a algunos autores que la interacción de los ligandos con el C1, ocurre únicamente en una de las copias del dominio.

En este sentido, se ha demostrado que cada copia C1 presente en las PKCc, exhibe mayor afinidad por uno de los dos tipos de compuestos (DAG o ésteres de forbol), estableciéndose de este modo, afinidades diferenciales entre los dos dominios C1 (Slater y col., 1996, Medkova y Cho, 1999). Así, el dominio C1A de la PKC α , muestra mayor afinidad por el DAG, mientras que el C1B es el encargado de unir los ésteres de forbol (Irie y col., 1998; Medkova y Cho, 1999). De este modo, en la PKC γ tanto el dominio C1A como el C1B son capaces de unirse indistintamente a DAG y a ésteres de forbol (Ananthanarayanan y col., 2003).

También éste es el caso de las PKCn donde los dos dominios C1 participan en funciones diferentes. Así, en el caso de la PKC δ , mientras que el dominio C1B juega un papel crítico en la interacción con el PMA (forbol 12-miristato-13-acetato) (Szallasi y col., 1996; Hunn y Quest, 1997; Bogi y col., 1998; Irie y col., 2002; Stahelin y col., 2004) el dominio C1A presenta una mayor afinidad por DAG (Stahelin y col., 2004). Sin embargo, en la isoenzima nueva PKC ϵ , se ha propuesto la mediación de ambos dominios C1 para unir con alta afinidad tanto DAG como ésteres de forbol, sugiriendo que ambos dominios juegan un papel importante en la localización de la proteína a la membrana y en la consecuente activación (Irie y col., 2002; Stahelin y col., 2005).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar la afinidad diferencial en estos dominios. Por un lado, hay autores que defienden la hipótesis de que se deba a una reordenación 3D del dominio C1 en la proteína completa que haga que un compuesto esté más accesible que otro, como es el caso de las PKC α , PKC γ , PKC δ y PKC ϵ las cuales presentan distintos mecanismos de unión y activación (Oancea y Meyer, 1998; Medkova y Cho, 1999; Ananthanarayanan y col., 2003;

Stahelin y col., 2004; Stahelin y col., 2005). Así, dominios C1 de otras proteínas como p.e. el dominio C1 de la proteína Munc 13-1 exhibe una afinidad más baja por la unión a ésteres de forbol que el dominio C1B de la PKC δ (Shen y col., 2005). La razón reside en la orientación de la cadena lateral de Trp588 (correspondiente a Trp 22 en todos los dominios C1 de las PKCs) la cual se encuentra dispuesta de tal modo que ocluye el sitio de unión para DAG/ésteres de forbol descendiendo así su afinidad por ambos ligandos (Shen y col., 2005). En el caso de los dominios C1A no existe ninguna estructura 3D resuelta por lo que no podemos dilucidar exactamente a qué se debe su actuación diferencial. Otros estudios *in vivo* con dominios C1 aislados de las isoenzimas de la PKC han demostrado que su localización en distintos compartimentos subcelulares hace que tengan diferente afinidad por los ésteres de forbol y el DAG (Lehel y col., 1995; Kashiwagi y col., 2002; Schultz y col., 2003; Carrasco y Mérida, 2004).

Esta unión del dominio C1 a DAG tan característica, es capaz de duplicar la actividad catalítica de la PKC unida a fosfatidilserina (Hannun y col., 1986, Mosior y Epanand, 1993, Newton y Keranen, 1994), y se ha demostrado que promueve la activación de la enzima inducida por ácidos grasos y fosfatidilcolinas de cadena corta (Walker y col., 1990).

Dentro de la elevada especificidad que muestra la PKC por los diferentes diacilgliceroles, la enzima presenta especial preferencia por el 1,2-*sn*-diacilglicerol (Newton, 1997). En esta especificidad, son importantes el grupo hidroxilo y las cadenas acílicas (Rando y Kishi, 1992), tanto por los enlaces éster de los ácidos grasos (Ganong y col., 1986), como por la posición que ocupan en la molécula (Osada y col., 1990; Sánchez-Piñera y col., 1999a) y su longitud y grado de saturación (Marignani y col., 1996; Schachter y col., 1996; Sánchez-Piñera y col., 1999a). En este sentido, algunos experimentos *in vitro* han demostrado que la activación de la PKC se ve más favorecida en presencia de los DAG con cadenas acílicas cortas e insaturadas, que de los que presentan cadenas largas y saturadas (Kishimoto y col., 1980; Mori y col., 1982; Sánchez-Piñera y col., 1999a).

El DAG, no suele estar presente en las membranas biológicas de las células en estado de reposo (Kikkawa y Nishizuka, 1986), sino que, tras la estimulación de ciertos receptores de la superficie celular,

se genera por la actuación de la fosfolipasa C (PLC) a partir de la hidrólisis de ciertos fosfolípidos de la membrana, entre los que se incluye el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂). Una vez sintetizado, el DAG se metaboliza rápidamente por la diacilglicerol-quinasa (DGK), que genera ácido fosfatídico como resultado de su actuación. No obstante, es relativamente frecuente que tras este primer descenso de los niveles de DAG, se produzca un nuevo aumento de la presencia de DAG en la membrana, debido nuevamente a la actuación de la PLC, que lo sintetiza partiendo de fosfatidilcolina (PC) (Lee y col., 1991, Holbrook y col., 1992, Lassegue y col., 1993, Jarpe y col., 1994). El DAG procedente de esta segunda vía, permanece en la membrana durante más tiempo, ya que es peor sustrato de la DGK, y su metabolización, mucho más lenta, está catalizada por la DAG-lipasa (Ford y Gross, 1990, Lee y col., 1991).

Por su parte, los ésteres de forbol, al igual que el DAG, aumentan la actividad catalítica del enzima. Sin embargo, la interacción de la PKC con los ésteres de forbol, es más fuerte y se mantiene durante más tiempo, que la establecida entre la proteína y el DAG. Esto se debe principalmente a que la metabolización de los ésteres, se produce de forma más lenta que la del DAG (Nishizuka, 1986; Mosior y Newton, 1996).

El descubrimiento de los ésteres de forbol como promotores de tumores, ha impulsado enormemente su investigación como herramientas farmacológicas para la manipulación de la PKC (Blumberg, 1988). Los resultados de varios estudios experimentales realizados al respecto, han confirmado la especificidad de los ésteres de forbol por su unión a las distintas isoenzimas de la PKC y además, ha quedado demostrado que las propiedades de la interacción PKC-éster de forbol, son dependientes de que la proteína esté asociada o no a la membrana (Hofmann, 1997; Slater y col., 1998, 2002).

1.3.2.3. Unión a otros lípidos diferentes de DAG/ésteres de forbol.

Además de la unión a DAG/ésteres de forbol, se ha demostrado que los dominios C1 son capaces de unirse a otros lípidos como los ácidos grasos libres y las ceramidas. Y no sólo eso, sino que los dominios C1 presentan una sensibilidad diferencial a estos tipos de lípidos ya que su unión resulta en la localización de las PKCs a

diferentes compartimentos subcelulares y la consiguiente activación, resaltando así la importancia que tiene el dominio C1 como un elemento regulador (Shirai y col., 1998; Kashiwagi y col., 2002; Becker y Hannun, 2003; Yagi y col., 2004). Por ejemplo, el dominio C1B pero no el C1A de la PKC ϵ se une a la ceramida y al ácido araquidónico, aunque cada uno de estos componentes produce un patrón de localización diferente debido a sus mecanismos de unión distintos (Kashiwagi y col., 2002).

En el caso de la isoenzima atípica PKC ζ , se ha demostrado que la unión de ceramidas al dominio C1 puede desencadenar en un cambio conformacional de la enzima que conlleve a la activación facilitando así la interacción de la PKC ζ con el inhibidor Par-4 (Van, 1998; Van y col., 2003; Wang y col., 2005). En general, estos hallazgos indican que cada subespecie de PKC tiene un mecanismo de actuación específico que es dependiente de señales extracelulares, y que una combinación de activadores intracelulares altera el sitio de unión de las PKC.

1.3.2.4. El dominio C1 se encuentra también en otras proteínas distintas de la PKC.

Además de las Proteínas Quinasas C, existe una amplia variedad de proteínas no relacionadas que también contienen dominios C1 típicos o atípicos. Éste es el caso de las Proteínas Quinasas D (PKC μ en ratón) (Valverde y col., 1994; Dieterich y col., 1996), quimerinas (Hall y col., 1990; Caloca y col., 1997), isoformas Unc-13 (Munc 13) (Brose y col., 1995), diacilglicerol quinasas (isoformas β y γ) (Van Blitterswijk y Houssa, 2000; Kanoh y col., 2002) las cuales sí se unen a diacilglicerol y ésteres de forbol y que por tanto poseen un dominio típico, sin embargo existen otras que poseen un dominio atípico ya que son insensibles al diacilglicerol/ésteres de forbol como las diacilglicerol quinasas (isoformas α , δ , η , κ , ϵ , ζ , ι , θ) (Van Blitterswijk y Houssa, 2000; Kanoh y col., 2002), proteínas Raf (Ghosh y col., 1994), Vav (Kazanietz y col., 1994), quinasa supresora de Ras (Zhou y col., 2002) y Rho quinasa (Narumiya y col., 1997), entre otras.

1.3.3. Dominio C2.

1.3.3.1. Estructura.

Hasta ahora se conocen las estructuras completas de varios dominios C2. Por análisis de difracción de rayos X y RMN se obtuvo la estructura secundaria del primer dominio C2, el de la sinaptotagmina I (Sutton y col., 1995; Shao y col., 1996). Posteriormente se obtuvo la estructura tridimensional del dominio C2 de la fosfolipasa C- δ 1 (Essen y col., 1996). Mediante cristalografía de rayos X se consiguió resolver la estructura tridimensional de los dominios C2 de la fosfolipasa A₂ (Perisic y col., 1998), de la PKC β (Sutton y Sprang, 1998), de la PKC δ (Pappa y col., 1998), de la PKC α (Verdaguer y col., 1999), de la PKC ϵ (Ochoa y col., 2001) y de la PKC η (Littler y col., 2006).

Los dominios C2 contienen motivos proteínicos altamente conservados de aproximadamente 130 aminoácidos, y que se encuentran en una gran variedad de proteínas implicadas en la señalización celular o en el transporte de vesículas (Nalefski y Falke, 1996; Rizo y Südhof, 1998). La estructura de estos dominios consiste en ocho cadenas β antiparalelas agrupadas en dos hojas de cuatro cadenas cada una formando un emparedado β compacto (Rizo y Südhof, 1998) (Figura I.6).

El dominio C2 de la PKC está presente en las isoenzimas clásicas y nuevas, sin embargo, las PKCa carecen de él (Newton y Johnson, 1998).

La disposición del dominio C2 de las PKCc es diferente a la de las PKCn, ya que en las PKCc, el dominio C1 precede al C2 en el extremo amino terminal de la cadena aminoacídica, mientras que en las PKCn, sucede lo contrario (Mellor y Parker, 1998, Rizo y Südhof, 1998) (Figura I.1).

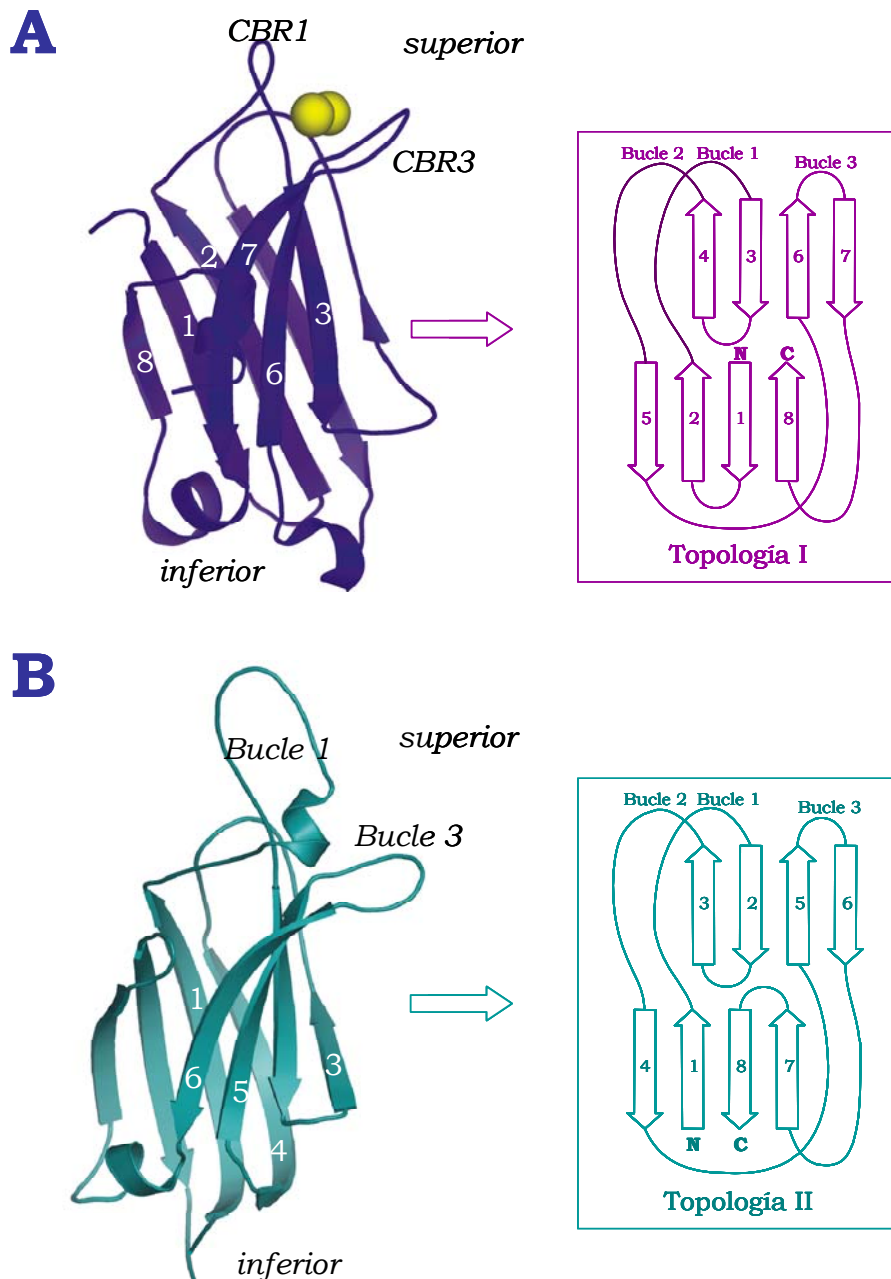


Figura I.6. Modelo estructural de los dominios C2 de la PKC α (A) y de la PKC ϵ (B). Se muestran los dos dominios C2 típicos de las PKC clásicas y nuevas, PKC α y PKC ϵ , respectivamente. Estos dominios se caracterizan por presentar ocho cadenas β antiparalelas agrupadas en dos hojas de cuatro cadenas cada una formando un emparedado β -compacto. Además, en esta figura también se pueden apreciar los dos tipos de topologías que presentan las isoenzimas de la PKC. Las PKC clásicas presentan una topología I mientras que las PKC nuevas presentan una topología II. La topología I posee los extremos amino y carboxilo terminal en la parte superior del emparedado β -compacto mientras que en la topología II dichos extremos se encuentran en la parte inferior del dominio. El dominio C2 de la PKC α aparece en presencia de dos iones Ca^{2+} (esferas amarillas) que aparecen unidos a través de la *región de unión de calcio*. Tomado de Verdaguer y col. (1999) y Ochoa y col. (2001).

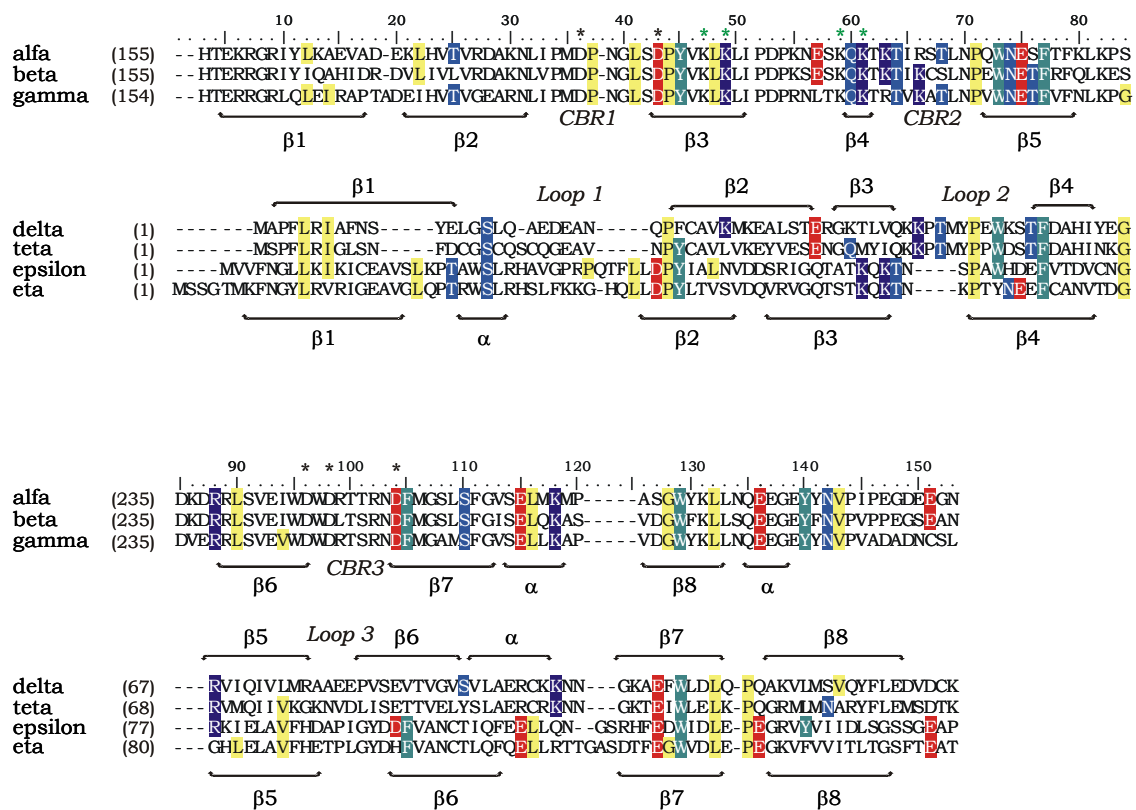


Figura I.7. Alineación de los siete dominios C2 de las PKC clásicas y nuevas.

Los residuos que aparecen coloreados son aquellos que presentan más de un 50% de homología. Los residuos aromáticos se muestran en verde, los residuos hidrofóbicos en amarillo, los residuos cargados positivamente en azul oscuro y los residuos cargados negativamente en azul claro. Los asteriscos negros indican los residuos de aspártico implicados en la coordinación de los iones Ca^{2+} mientras que los asteriscos de color verde indican los residuos de lisina localizados en la denominada *región rica en lisinas* presente en las PKC clásicas. Tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, (2006).

La secuencia de los dominios C2 estudiados hasta la fecha, parece estar muy conservada en las cadenas β . Sin embargo, en las regiones de conexión entre dichas cadenas β , existe una gran variabilidad secuencial, y además, son frecuentes los residuos de Pro e His, lo que posibilita la formación de giros en estas zonas del dominio. Es por ello, que a las cadenas β se les ha atribuido una función meramente estructural, mientras que la especificidad funcional del dominio, parece residir en los bucles de conexión entre las cadenas (Nalefski y Falke, 1996) (Figura I.7).

Las cadenas β del dominio C2 pueden estar interconectadas de dos formas diferentes, lo que genera dos posibles topologías para el dominio C2, la topología I y II, que resultan fácilmente interconvertibles (Figura I.6). Tal es así, que para pasar de la

topología I a la II, es suficiente la fusión de los extremos amino y carboxilo terminal, y la reaparición de dichos extremos por ruptura del enlace entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ (Nalefski y Falke, 1996) (Figura I.6). Aunque no se conocen exactamente las diferencias que implican la aparición del dominio C2 en una u otra topología, parecen ser determinantes para la orientación del dominio C2 respecto al resto de los dominios presentes en la PKC (Rizo y Südhof, 1998).

Tras la resolución de la estructura cristalina de los dominios C2 de algunas de las isoenzimas de la PKC, y a la vista de los resultados obtenidos, parece ser que invariablemente, el dominio C2 de las PKCc es de topología I, mientras que en las PKCn, los dominios C2 corresponden a la topología II (Pappa y col., 1998; Sutton y Sprang, 1998; Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2001).

1.3.3.2. Función y regulación.

El dominio C2, en las PKC donde está presente, desempeña un papel fundamental en la activación de la proteína ya que, junto con el dominio C1, es el responsable del anclaje de ésta a la membrana. El modo por el cual el dominio C2 enlaza la proteína a la membrana se debe a la interacción con los fosfolípidos presentes en ella. En las PKCc, para que el dominio C2 se pueda unir a la membrana, debe encontrarse asociado a iones Ca^{2+} , condición que no parece ser necesaria en el caso de las isoenzimas nuevas (Coussens y col., 1986; Rizo y Südhof, 1998; Corbalán y col. 1999, 2003a y b; Verdaguer y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2000, 2001; Ochoa y col., 2001).

Además de su función como anclaje de la proteína a la membrana, son varios los estudios que han implicado al dominio C2 de la PKC en las interacciones proteína-proteína. Se ha demostrado que la interacción del C2 de la PKC con las proteínas RACK (receptores para PKC activadas), es determinante para la adecuada localización de la proteína en los diferentes compartimentos celulares y se sabe, que el dominio C2 de la PKC δ , media la interacción de esta isoenzima con la proteína GAP-43, a la que se ha implicado en procesos de diferenciación neuronal (Dekker y Parker, 1997; Mochly-Rosen, 1995; Csukai y col., 1997; Katan y Allen, 1999).

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 debido a que los dominios C1 y C2 presentes en la región reguladora interaccionan con sus respectivos ligandos y que por tanto, actúan como cofactores en la activación de la enzima.

Tales ligandos para el caso del dominio C2, son el Ca^{2+} y los fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (Newton y Johnson, 1998; Verdaguer y col., 1999).

Así, no sólo la fosfatidilserina sino otros fosfolípidos aniónicos como el fosfatidilglicerol, el ácido fosfatídico y el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) son capaces de activar a la PKC en presencia de Ca^{2+} (Bazzi y Nelsestuen, 1987; Lee y Bell, 1991; Newton, 1993). También se ha visto que intervienen en la regulación otros lípidos como las ceramidas (Kashiwagi y col., 2002; Yakushiji y col., 2003), algunos éteres lipídicos antitumorales (Daniel y col., 1995; Gil y col., 1996; Aroca y col., 2001), los ácidos grasos insaturados como el ácido araquidónico (Shinomura y col., 1991; Khan y col., 1995; Oancea y col., 1998; O'Flaherty y col., 2001; López-Nicolás y col., 2005) y los compuestos retinoides (Rosenbaum y Niles, 1992; Randominska-Pandya y col., 2000; Boskovic y col., 2002; López-Andreo y col., 2005).

De todos ellos, el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ es uno de los fosfolípidos objeto de estudio en esta memoria y es por ello por lo que hemos considerado necesario realizar una introducción más extensa en lo que concierne a éste.

Los fosfoinosítidos componen un grupo minoritario de fosfolípidos membranales, ya que suponen aproximadamente el 5% de la composición lipídica total. Y dentro de ellos, el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ es el fosfoinosítido más abundante de la membrana plasmática de células de mamífero constituyendo así el 1% del total (Stephens y col., 1993).

Respecto a la estructura de la molécula de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Figura I.8) se desconoce la orientación de su cabeza polar respecto a la superficie de la membrana, pero estudios recientes apuntan a que por su estructura erguida y su gran tamaño, el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ podría

potencialmente sobresalir a la fase acuosa mucho más que los fosfolípidos típicos (Mc Laughlin y col., 2002). La carga neta del PtdIns(4,5)P₂ depende de varios factores tales como el pH y su interacción con las proteínas; así por ejemplo, a pH 7.0 el PtdIns(4,5)P₂ posee una carga neta de -4 (McLaughlin y col., 2002).

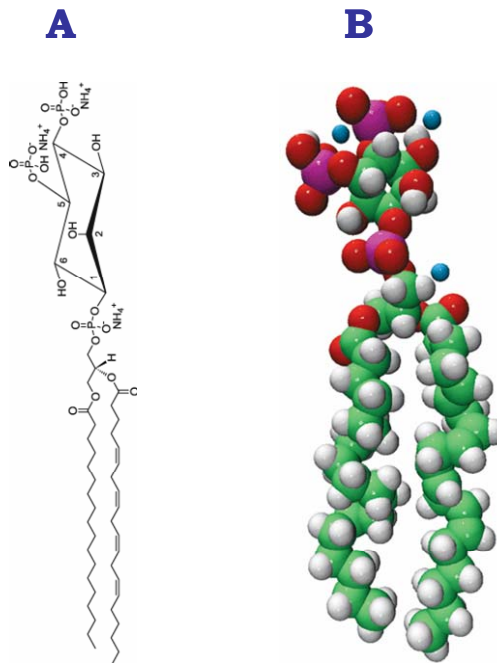


Figura I.8. Representación esquemática de la estructura del fosfoinosítido PtdIns(4,5)P₂.

A pesar de que la concentración de PtdIns(4,5)P₂ efectiva en la célula es muy baja ($\approx 10 \mu\text{M}$) éste se encuentra implicado en multitud de funciones fisiológicas en el interior de la célula (Figura I.9). Una de las funciones esenciales que desempeña el PtdIns(4,5)P₂ es que sirve de fuente de tres segundos mensajeros: inositol-1,4,5-trifosfato (Ins-1,4,5-P₃), el diacilglicerol (DAG) y el fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns-3,4,5-P₃) siendo así el responsable de un amplio número de eventos que tienen lugar en la membrana (Czech, 2000; Caroni, 2001; McLaughlin y col., 2002; Lemmon, 2003; McLaughlin y Murray, 2005). La activación de la PLC mediada por receptores, tirosina quinasa o asociados a proteínas G, cataliza la hidrólisis de PtdIns(4,5)P₂ para producir los segundos mensajeros DAG e Ins-1,4,5-P₃ (Berridge e Irvine, 1984). El Ins(1,4,5)P₃, a su vez, induce la salida de Ca²⁺ de los almacenes intracelulares (Clapham, 1995; Berridge y col., 2000), mientras que el DAG permanece en la membrana ayudando a la activación de PKC por unión a su dominio

C1 (Hurley y Misra, 2000). El PtdIns(3,4,5)P₃, que se puede formar a partir de la fosforilación de PtdIns(4,5)P₂ por la PI3 quinasa (PI3K), es también un auténtico segundo mensajero que actúa en el anclaje a la membrana para un gran número de proteínas (Czech, 2000).

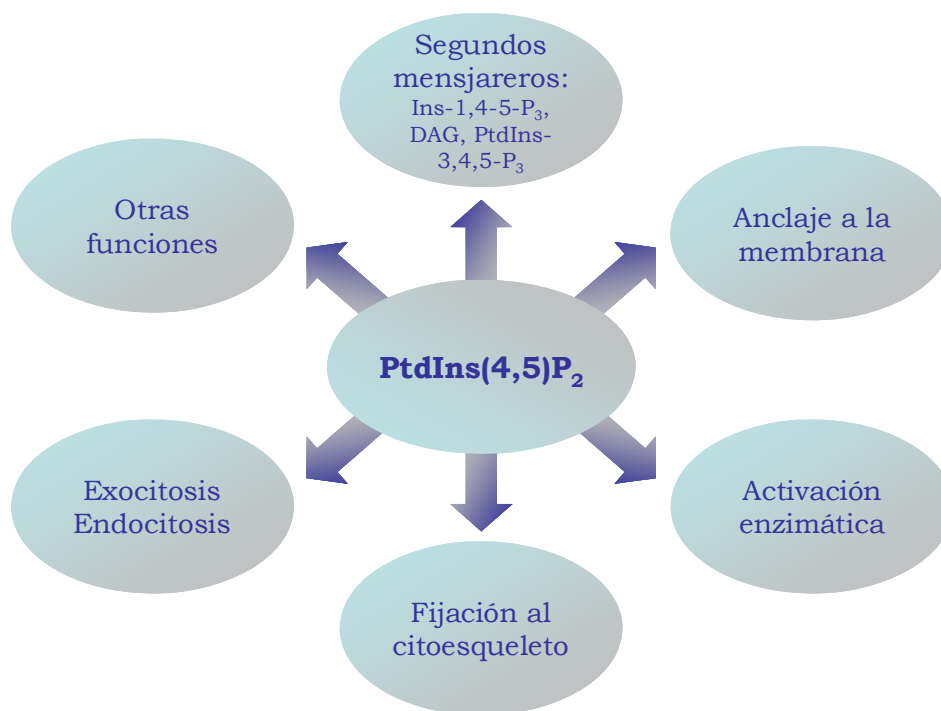


Figura I.9. Modelo esquemático de las funciones que desempeña el PtdIns(4,5)P₂ en las células.

Otras funciones atribuidas al PtdIns(4,5)P₂ es que interviene en procesos de activación de enzimas como la fosfolipasa D (Liscovitch y col., 1994), parece ser un regulador importante en funciones tales como exocitosis, endocitosis, complejos de adhesión focal, regulación de canales iónicos en la membrana plasmática, procesos de polimerización de actina y de anclaje a la membrana, entre otros (Downes y col., 2005; McLaughlin y Murray, 2005).

Con el fin de entender la multitud de funciones que desempeña el PtdIns(4,5)P₂, varios autores consideran que ello es debido bien a su localización espacial o bien a que existan diferentes reservas de PtdIns(4,5)P₂ en el interior de la célula. De hecho, trabajos recientes indican que hay ciertas regiones de la membrana plasmática que concentran el PtdIns(4,5)P₂. Para dar explicación a estos resultados se puede considerar que pueden ocurrir por dos mecanismos: la síntesis local de PtdIns(4,5)P₂ y/o el secuestro electrostático. Por un

lado, el proceso de síntesis viene acoplado al de degradación lo que conlleva a la aparición/desaparición de fosfoinosítidos y parece ser un proceso muy importante en orgánulos tales como los fagosomas (Marshall y col., 2001). Y por otro lado, el proceso de secuestro electrostático es desempeñado por diferentes proteínas siendo una de ellas una proteína nativa no estructurada que a su vez es proteína sustrato de la PKC, las proteínas MARCKS. Estas proteínas, poseen un dominio efector de carácter básico lo que genera un potencial electrostático positivo que permite la atracción de una fracción importante de PtdIns(4,5)P₂ en la célula conllevando así a la concentración del mismo en dominios laterales de la membrana. La unión de este PtdIns(4,5)P₂ es reversible y es liberado en respuesta a señales locales como un aumento en la concentración de Ca²⁺ o la activación de la PKC para, a su vez, interactuar con otras moléculas biológicamente importantes (Arbuzova y col., 1998; McLaughlin y Aderem, 1995; Ohmori y col., 2000).

Estudios previos realizados por nuestro grupo han permitido conocer que la PKC α es capaz de activarse mediante PtdIns(4,5)P₂. Esta activación tiene lugar a través de una región denominada *región rica en lisinas* que es distinta a la región por donde se une la fosfatidilserina y está situada entre las cadenas β 3 y β 4 del dominio C2. Además, esta interacción requiere de la presencia de Ca²⁺ para que la enzima adopte una conformación abierta y permita que este fosfolípido pueda interactuar con dicha *región rica en lisinas* (Corbalán-García y col., 2003a; Marín-Vicente y col., 2005).

No sólo la PKC es capaz de unirse al PtdIns(4,5)P₂ (Corbalán-García y col., 2003a) sino también se han descrito otras proteínas capaces de unirse a este fosfoinosítido. Tal es el caso de los *dominios PH* presentes en proteínas como la Fosfolipasa C la cual une PtdIns(4,5)P₂ con una elevada afinidad del orden de 2 μ M en experimentos realizados de ITC (Lemmon y col., 1995). Los *dominios ENTH*, pertenecen a la familia de las epsinas, parece ser que su unión al PtdIns(4,5)P₂ es esencial para el proceso de endocitosis (Gillooly y Stenmark, 2001; Martin, 2001). Los *dominios FERM* son miembros de la familia Ezrina/Moesina/Radixina y su unión a PtdIns(4,5)P₂ implica la liberación del dominio autoinhibitorio del sitio catalítico permitiendo así la unión a otras proteínas como CD44 y a los filamentos de actina de la membrana plasmática (Hamada y col., 2000; Tsukita y Yonemura, 1999). Otras proteínas que parecen

unirse al PtdIns(4,5)P₂ pero por el momento se desconoce la implicación de dicha interacción es el caso de los dominios PX y los dominios Tubby, entre otros.

1.3.3.3. Dominio C2 de las PKCc.

Los dominios C2 de las PKCc, tal y como se citó anteriormente, presentan topología I y se unen a fosfolípidos cargados negativamente de forma dependiente de iones Ca²⁺.

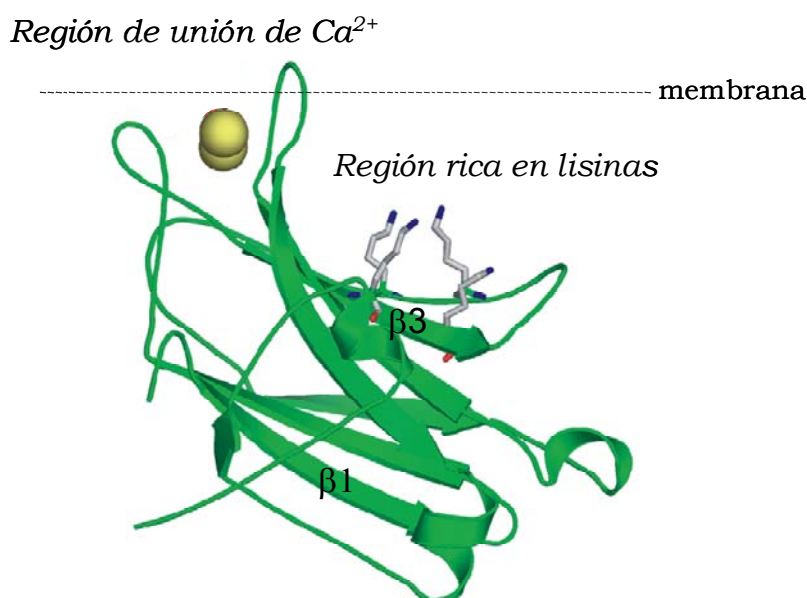


Figura I.10. Estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α . Se muestra el dominio C2 de la PKC α en presencia de dos iones Ca²⁺ que se unen a través de la *región de unión de calcio*, lugar donde tiene lugar la interacción de fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina. Además también se detalla la *región rica en lisinas* situada entre las hojas β 3 y β 4 del dominio donde los residuos de lisina aparecen en modelo de barras y lugar donde recientemente se ha descubierto que pueden interaccionar otros fosfolípidos aniónicos distintos de fosfatidilserina como el PtdIns (4,5)P₂ (Corbalán-García y col., 2003a; Marín-Vicente y col., 2005).

De entre todos los fosfolípidos aniónicos estudiados, la mayoría de isoenzimas de la PKC muestran mayor preferencia por fosfatidilserina. Dicha especificidad, parece deberse, al menos en parte, a la presencia del grupo L-serina, ya que las alteraciones en la estereoquímica de este grupo, o la eliminación de uno o más grupos funcionales, generan fosfolípidos incapaces de activar a la PKC. También parece ser crítica la distancia entre estos grupos funcionales y el fosfato (Lee y Bell, 1989).

En la PKC α , se ha identificado el lugar de unión a diferentes lípidos como es el caso de la fosfatidilserina que interacciona a través de la denominada *región de unión de calcio* y el PtdIns(4,5)P₂ el cual interacciona a través de la recientemente descubierta *región rica en lisinas* (Ochoa y col., 2002; García-García y col., 2001, Corbalán-García y col., 2003a) (Figura I.10).

Además de la fosfatidilserina y el PtdIns(4,5)P₂, se ha demostrado la capacidad de otros fosfolípidos para inducir la activación de la PKC, entre ellos, el ácido fosfatídico (PA), el ácido todo-*trans*-retinoico (Ochoa y col., 2003; López-Andreo, 2005) y el ácido araquidónico (López-Nicolás y col., 2006).

1.3.3.3.1. Región de unión de calcio y a fosfolípidos como fosfatidilserina.

En las PKC ϵ la presencia de iones Ca²⁺ unidos al dominio C2, es necesaria para el enlace de éste a la membrana, ya que aumenta su afinidad por fosfolípidos aniónicos (Newton y Keranen, 1994). Además, se ha demostrado que la unión de Ca²⁺ al dominio C2, contribuye a la estabilización del complejo PKC-lípido (Lester y col., 1990) y parece ser un requisito necesario para la retirada del pseudosustrato del sitio catalítico en esta clase de isoenzimas (Oancea y Meyer, 1998).

La regulación de las PKC ϵ por el Ca²⁺ es muy precisa y prueba de ello es, que se ha demostrado que cada uno de los procesos que conducen a la activación de la enzima, requiere una determinada concentración del ión, de modo que la concentración de iones Ca²⁺ necesaria para la unión de la proteína a la membrana, resultaría bastante inferior a la requerida para la salida del pseudosustrato de la región catalítica de la PKC y su posterior activación (Keranen y Newton, 1997).

En todos los dominios C2 estudiados, la unión de iones Ca²⁺ se produce en los bucles de conexión de las cadenas situados en la parte superior del dominio. Por ello, a cada uno de los tres bucles presentes en esta región de la proteína se les denomina, CBR1 (región de unión de calcio 1), CBR2 y CBR3, en orden desde el extremo amino terminal de la cadena.

Dentro de las PKC ϵ , el primer dominio C2 cuya estructura tridimensional se resolvió, fue el correspondiente a la PKC β complejado con tres iones Ca $^{2+}$, dos de los cuales, aparecen coordinados con cinco Asp (187, 193, 246, 248, 254) mientras que la coordinación del tercer ión Ca $^{2+}$, incluye al Asp254 y al Asp248 (Sutton y Sprang, 1998).

Posteriormente se resolvió la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α unido a dos iones Ca $^{2+}$ y una molécula de dicaproil-*sn*-glicero-fosfatidilserina (DCPS) (Verdaguer y col., 1999) (Figura I.11A).

En la PKC α , uno de los iones Ca $^{2+}$ (Ca1), se localiza en el bucle formado por las cadenas β 2 y β 3 (CBR1) y el otro ión Ca $^{2+}$ (Ca2), entre las cadenas β 6 y β 7 (CBR3). Estas posiciones coinciden con las de dos, de los tres iones Ca $^{2+}$ unidos al dominio C2 de la PKC β , pero en el lugar ocupado por el tercer ión Ca $^{2+}$ en el dominio C2 de PKC β , aparece en la PKC α , una molécula de agua.

En el dominio C2 de la PKC α , los residuos de Asp implicados en la coordinación de los iones Ca $^{2+}$ corresponden a las posiciones 187, 193, 246, 248 y 254, y de entre ellos, los Asp 187, 246 y 248, participan simultáneamente en la coordinación de ambos iones. Estos residuos junto con la cadena principal de la Met186 y el Trp248, aportan seis de los siete oxígenos necesarios para la coordinación de cada ión Ca $^{2+}$; mientras que el séptimo oxígeno del Ca1, es aportado por el grupo fosforilo de la DCPS, y el del Ca2, por la molécula de agua (Verdaguer y col., 1999) (Figura I.11B). Además, tres residuos más, las Arg 216, 219 y la Thr 251, establecen puentes de hidrógeno directos con los oxígenos del grupo carbonilo de la DCPS e interacciones hidrofóbicas con las cadenas acílicas del fosfolípido.

Por tanto DCPS se encuentra coordinando, a través de su grupo serina, uno de los iones Ca $^{2+}$. Esto sugirió un nuevo modelo de interacción del dominio C2 con Ca $^{2+}$ y fosfatidilserina, en el cual el papel del Ca1 es el de establecer un puente entre la proteína y la molécula de fosfolípido del mismo modo que lo hacen la fosfolipasa A2 y la anexina V (Huber y col., 1990; Swairjo y col., 1995). Además, interacciones directas del lípido con otros residuos del dominio C2

bloquearían el puente que establece el ión Ca^{2+} entre el lípido y la proteína aumentando la constante de afinidad aparente del dominio C2 hacia el Ca^{2+} y el fosfolípido (Shao y col., 1996; Nalefski y col., 1997).

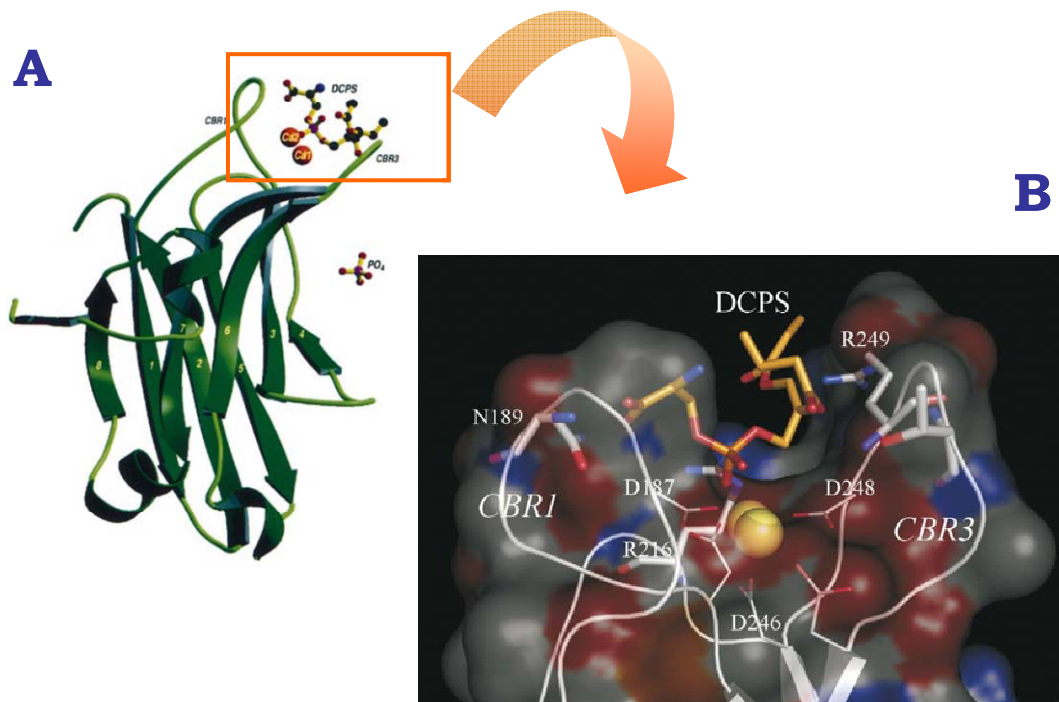


Figura I.11. Estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α unida a Ca^{2+} y a DCPS (A) y representación esquemática de los residuos de aspártico implicados en la coordinación de iones Ca^{2+} y en la unión a DCPS (B). (A) Se muestra el dominio C2 de la PKC α en presencia de dos iones Ca^{2+} y de una molécula del fosfolípido aniónico 1,2-*sn*-dicaproil-glicero-fosfatidilserina (DCPS) que se unen a través de la *región de unión de calcio* (Ochoa y col. 2002). (B) Se muestra, a modo detallado, la *región de unión de calcio* y dentro de ella, los residuos de Asp de las Regiones de unión de calcio 1 y 3 (CBR1 y CBR3) que directamente están implicados tanto en la unión a DCPS como en la coordinación de dos iones Ca^{2+} . Como se puede apreciar (A y B), estos residuos forman una cavidad en la parte superior del dominio formando lo que se conocen las Regiones de unión de calcio 1, 2 y 3 (CBR1, CBR2 y CBR3). Tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández (2006).

También estudios de mutagénesis en la *región de unión de calcio* demostraron que, por sí solos, los iones Ca^{2+} y sus ligandos juegan papeles distintos en los procesos de unión a la membrana y de activación de la PKC α . Este modelo sugirió que Ca1 está implicado en el anclaje inicial a la membrana mientras que los iones Ca2 y Ca3 están implicados en los cambios conformacionales (Edwards y Newton, 1997; Medkova y Cho, 1998b; Corbalán-García y col., 1999; García-García y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2000; Bolsover y

col., 2003). Además, Asn189 parece ser el sitio de reconocimiento específico para el motivo serina jugando un papel importante en la activación de la enzima. Resultados similares se observaron cuando se mutó el residuo de Arg216 por Ala, sugiriendo que estos residuos son importantes en la estabilización del complejo proteína-membrana en bicapa lipídica (Conesa-Zamora y col., 2001; Bolsover y col., 2003). Sin embargo, los residuos Arg249 y Thr 251 juegan un papel más importante en los procesos de anclaje y por consiguiente, en la activación de la enzima (Conesa-Zamora y col., 2001; Bolsover y col., 2003).

En cuanto a las afinidades para unir Ca^{2+} en las PKC α , β y γ , aunque presentan un 64% de homología, se han observado diferencias en la afinidad por este ión así como en la estequiometría y la cooperatividad (Sutton y Sprang, 1998; Nalefski y Newton, 2001; Kohout y col., 2002; Ochoa y col., 2002). Mediante estudios de FRET (transferencia de energía por emisión de fluorescencia), ITC (calorimetría de titulación isotérmica) y DSC (calorimetría diferencial de barrido) se ha demostrado que las tres isoenzimas, PKC α , β y γ , son capaces de unir 2 o 3 iones Ca^{2+} . Sin embargo, las afinidades de unión varían entre una isoenzima y otra, siendo la PKC γ > PKC α > PKC β . Esto sugiere que el pequeño aumento citosólico de Ca^{2+} permite que la PKC γ responda de un modo más eficaz que la PKC α y que la PKC β , por orden de afinidades (Sutton y Sprang, 1998; Kohout y col., 2002; Ochoa y col., 2002; Torrecillas y col., 2004).

Estas diferencias observadas en los tres dominios podrían estar relacionadas con su especialización fisiológica, con su presencia en distintos tipos y compartimentos celulares. Con ello lo que se demuestra es que estos dominios aunque están íntimamente relacionados, están especializados en las distintas y versátiles interacciones con las membranas (Corbalán-García y col., 1999; García-García y col., 1999; Medkova y Cho, 1999; Johnson y col., 2000; Nalefski y Newton, 2001; Nalefski y col., 2001; Kohout y col., 2002; Ochoa y col., 2002; Torrecillas y col., 2003; Torrecillas y col., 2004).

Teniendo en cuenta estos estudios tanto bioquímicos como celulares, se puede proponer un modelo secuencial para la unión de

las PKC α a la membrana y su posterior activación. Así, en el primer paso, un aumento de Ca²⁺ intracelular produce la unión de Ca1 y Ca2 aún estando la proteína en el citosol, produciendo la unión de la proteína a la membrana a través del dominio C2. De los dos iones Ca²⁺, es el ión Ca1 el responsable de establecer el puente entre la proteína y las moléculas de fosfolípidos, las cuales son también reconocidas por los residuos Asn189 y Arg216 del dominio C2. Mientras que el ión Ca2 es el responsable de mantener a Ca1 en una localización apropiada y de inducir el cambio conformacional de la PKC, la cual penetra parcialmente en la membrana y se une a la bicapa de fosfolípidos a través de la CBR3 (Arg249 y Thr251). Una vez que la proteína se encuentra en la membrana, un tercer ión Ca²⁺, Ca3, se puede unir con el fin de estabilizar el complejo C2-membrana, haciendo posible que la proteína permanezca en la membrana un periodo de tiempo más largo, permitiendo así que el dominio C1 interactúe con el DAG dirigiendo así a la activación de la enzima (Medkova y Cho, 1998b; Oancea y Meyer, 1998; Corbalán-García y col., 1999; Conesa-Zamora y col., 2000; Feng y col., 2000; Conesa-Zamora y col., 2001; Nalefski y Newton, 2001; Bolsover y col., 2003).

1.3.3.3.2. Región rica en lisinas.

La cristalización del dominio C2 de la PKC α en presencia de Ca²⁺ y de 1,2-diacetil-*sn*-fosfatidil-L-serina (DAPS) demostró la presencia de un sitio adicional para la unión de fosfolípidos aniónicos en la proximidad de una región conservada rica en residuos de lisinas en las PKC α , la *región rica en lisinas* (Ochoa y col., 2002) (Figura I.12).

En concreto, los residuos de lisina implicados se trataron de las Lys197 y Lys199 localizadas en la hoja β 3 y las Lys 209 y Lys 211 presentes en la hoja β 4 (Figura I.13) Estos residuos cargados positivamente establecen una sucesión de interacciones de tipo electrostático con una segunda molécula de DAPS. Esto demuestra que este área rica en cargas positivas y alejada de la *región de unión de calcio*, lugar donde interacciona una primera molécula de DAPS, podría unir otras moléculas cargadas negativamente tales como o-fosfo-L-serina (Sutton y Sprang, 1998), fosfato (Verdaguer y col., 1999), ácido fosfatídico (Ochoa y col., 2002) o ácido todo-*trans*-retinoico (Ochoa y col., 2003; López-Andreo y col., 2005). Por consiguiente, se realizaron ensayos bioquímicos más amplios para

evaluar la relevancia de este sitio para la localización y activación de la enzima completa. Sin embargo, estudios de mutagénesis del dominio C2 aislado demostraron que esta *región rica en lisinas* no es importante para la unión del dominio de un modo dependiente de Ca^{2+} /fosfatidilserina y sorprendentemente sólo en ausencia de Ca^{2+} llegaron a ser evidentes algunos de los efectos de estas mutaciones sobre la unión a vesículas (Ochoa y col., 2002).

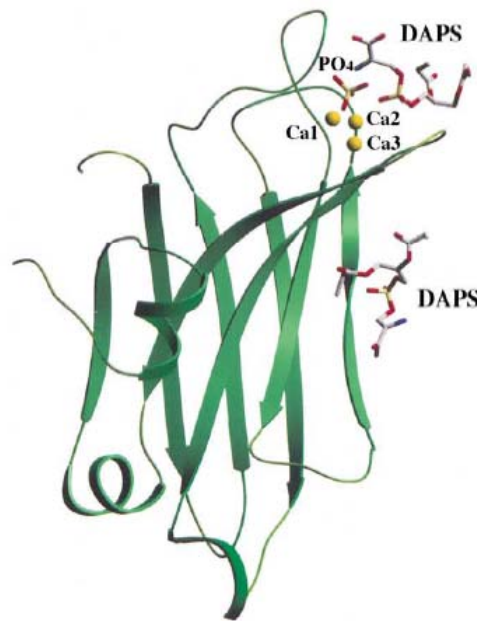


Figura I.12. Estructura tridimensional del dominio C2 de la PKCα en presencia de Ca^{2+} y DAPS. Se muestra el dominio C2 de la PKCα en presencia de tres iones Ca^{2+} y una molécula de DAPS (1,2-diacetil-*sn*-glicerofosfatidilserina) que se unen a través de la *región de unión de calcio*. Además también se detalla la unión de una segunda molécula de DAPS que tiene lugar a través de la *región rica en lisinas* situada entre las hojas β_3 y β_4 del dominio. Tomado de Ochoa y col. (2002).

Mediante un estudio bioquímico más extensivo utilizando diferentes fosfolípidos ácidos demostraron que el dominio C2 de la PKCα se une preferentemente a $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ a través de las cadenas β_4 de la *región rica en lisinas* (Corbalán-García y col., 2003a), conllevando a la activación de la PKCα mediante un mecanismo diferente al descrito para las PKC ϵ (Figura I.13). Aún más, estudios en células PC12 diferenciadas han demostrado que, tras la generación de un flujo de Ca^{2+} , este sitio es importante para el anclaje de la proteína a la membrana de un modo dependiente de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Marín-Vicente y col., 2005). Otros trabajos han demostrado que este sitio confiere a la proteína especificidad para unirse la proteína a la membrana y no a otras organelas

citoplasmáticas (Evans y col., 2006), todo ello nos hace pensar que el PtdIns(4,5)P₂ es un elemento importante en las células pero si su presencia es siempre necesaria en todos los sistemas celulares es aún una incógnita por averiguar. Estudios previos de resonancia paramagnética electrónica y difracción de rayos X sugieren que este sitio se encuentra dispuesto en una orientación casi paralela con respecto a la superficie de la membrana plasmática siendo compatible con la posibilidad de que el dominio C2 se pueda unir a la membrana a través de sus dos motivos, la *región de unión de calcio* y la *región rica en lisinas* (Hurley y Meyer, 2001; Ochoa y col., 2002; Verdaguer y col., 1999; Kohout y col., 2003).

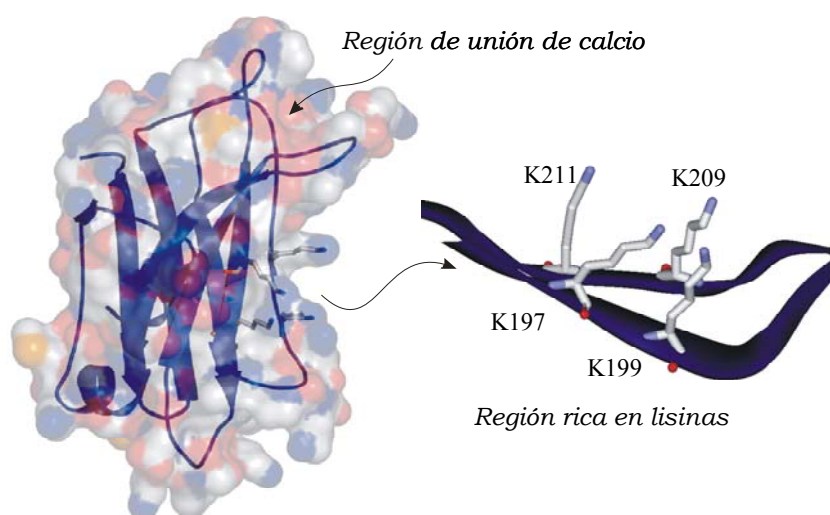


Figura I.13. Estructura tridimensional del dominio C2 de la PKCα. En esta figura se muestran las dos regiones de unión a lípidos, la *región de unión de calcio* y la *región rica en lisinas*. En especial, se resaltan los residuos cationicos de la *región rica en lisinas* presentes en las hojas β3 (Lys 197 y Lys 199) y β4 (Lys 209 y Lys 211) del dominio C2α y que están implicados en la unión a diferentes tipos de lípidos como es el PtdIns(4,5)P₂. Estos residuos de Lys aparecen en modelo de barritas donde los átomos de carbono aparecen en color gris mientras que los de nitrógeno aparecen en azul. Tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, (2006).

En este sentido, estudios anteriores ya habían demostrado que el dominio C2 de la PKCα presenta dos modos de unión distintos al ácido retinoico. En concreto, lo que se estudió fue que el ácido todo *trans*-retinoico es capaz de unirse tanto a la *región de unión Ca²⁺* como a la *región rica en lisinas* pero dicha unión producía un efecto activador en el primer sitio mientras que la unión en el segundo producía la inhibición de la enzima (Ochoa y col., 2003; López-Andreo y col., 2005). La existencia de estos dos sitios de unión tan distintos en el dominio C2 nos lleva a pensar que las PKCc podrían estar

funcionando en una amplia variedad de caminos hasta ahora desconocidos, ya que estas proteínas pueden ser activadas tanto de un modo dependiente de fosfatidilserina y/o de PtdIns(4,5)P₂.

Además, este sitio de unión específico para PtdIns(4,5)P₂ también ha sido descrito muy recientemente en otras proteínas que contienen dominios C2. Éste el caso del dominio C2 de la sinaptotagmina I (Bai y col., 2004) y el C2 α de la fosfatidilinosítido-3-quinasa (Liu y col., 2006).

Como anteriormente hemos citado, el dominio C2 está implicado en las interacciones proteína-proteína. Parece ser que es esta *región rica en lisinas*, la que interviene en dichas interacciones. Así por ejemplo, este es el caso de la interacción entre la PKC β y los receptores para PKC activadas (RACK) en presencia de Ca²⁺ y fosfatidilserina (Mochly-Rosen y col., 1992; Ron y Mochly-Rosen, 1995). Las regiones implicadas corresponden a las cadenas β 3, β 4 y β 5 que previamente habían sido propuestas como regiones que contienen sitios de unión para RACK (Ron y col., 1995). Estudios posteriores sugieren que estos sitios podrían establecer una interacción intramolecular con la región V5 de la PKC β cuando la enzima se encuentra en estado inactivo (Stebbins y Mochly-Rosen, 2001; Banci y col., 2002).

Además, esta hipótesis de interacciones de tipo intramolecular se corroboró en un estudio donde la sustitución simultánea de los residuos de Lys197/Lys199/Lys 211 por Ala convertía a la enzima en una quinasa constitutivamente activa, reduciendo así su necesidad por el Ca²⁺ y por fosfatidilserina o PtdIns(4,5)P₂ para su activación (Rodríguez-Alfaro y col., 2004). Sorprendentemente, este efecto no se correlacionó con la unión a la membrana, observación que proporcionaba la primera evidencia de la existencia de un desacoplamiento entre la interacción con la membrana a través del dominio C2 y los procesos de activación. Esto inmediatamente sugirió la idea de que la *región rica en lisinas* podría participar en una interacción intramolecular que mantiene a la enzima en una conformación inactiva la cual es liberada cuando fosfolípidos ácidos compiten con dichas interacciones intramoleculares por unirse a esta región (Rodríguez-Alfaro y col., 2004). Situaciones similares se han encontrado recientemente en la estructura de las β 2-quimerinas (Canagarajah y col., 2004), proteínas activadoras de GTPasas que

contienen dominios C1, en las cuales la unión del dominio C1 al fosfolípido ácido produce una disociación cooperativa de varias interacciones intramoleculares que mantienen a la enzima en una conformación inactiva.

1.3.3.4. Dominio C2 de las PKCn.

En las PKCn, el dominio C2, es el primer dominio conservado desde el extremo amino terminal de la cadena y presenta topología II. El ejemplo más clásico de esta topología de dominio C2, es el de la fosfolipasa C (PLC) que para desempeñar su función requiere de la presencia de iones Ca^{2+} . Sin embargo, los dominios C2 de topología II presentes en las PKCn, no necesitan iones Ca^{2+} para su intervención en la activación de la enzima (Nalefski y Falke, 1996; Rizo y Südhof, 1998; García-García y col., 2001; Ochoa y col., 2001; Corbalán-García y col., 2003b).

Tradicionalmente, el dominio C2 de las PKCn se ha relacionado con el establecimiento de interacciones proteína-proteína (Mellor y Parker, 1998; Newton, 2001), y se ha demostrado que, al menos en el caso de la PKC ϵ , el dominio C2 es capaz de unir fosfolípidos aniónicos de forma independiente de iones Ca^{2+} (Medkova y Cho, 1998b). Los experimentos *in vitro* realizados con el dominio C2 aislado de esta misma isoenzima, mostraron que presentaba mayor afinidad de unión por ácido fosfatídico que por fosfatidilserina, a diferencia del resto de isoenzimas de la PKC estudiadas (García-García y col., 2001; Corbalán-García y col., 2003b).

La PKC δ fue la primera isoenzima de la clase de las PKCn donde se resolvió la estructura tridimensional del dominio C2 (Pappa y col., 1998). Posteriormente, se resolvió la correspondiente al dominio C2 de la PKC ϵ , tanto en ausencia, como en presencia de DCPS (1,2-dicaproil-*sn*-fosfatidil-L-serina) y DCPA (1,2-dicaproil-*sn*-ácido fosfatídico) (Ochoa y col., 2001).

Al comparar la estructura de estos dos dominios pertenecientes ambos a isoenzimas nuevas, se observa curiosamente, que la homología encontrada entre ellos, es tan solo de un 19%, mientras que el porcentaje aumenta si la comparación se establece entre la estructura del dominio C2 de la PKC ϵ y la de otros dominios C2, tanto de topología I como de topología II (Ochoa y col., 2001).

En los dominios C2 de topología I, las posiciones de las regiones de unión a iones Ca^{2+} (CBR) situadas en los bucles entre las cadenas $\beta 3$ y $\beta 4$ (CBR1) y $\beta 6$ y $\beta 7$ (CBR3), corresponden respectivamente en la topología II a los bucles situados entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ y $\beta 5$ y $\beta 6$.

Las variaciones que presentan los cristales del dominio C2 de la PKC ϵ complejado a DCPS o a DCPA con respecto a la estructura sin lípido, demuestran que los bucles de conexión de las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$ (bucle 1) y $\beta 5$ y $\beta 6$ (bucle 3), son los responsables de la unión del dominio a fosfolípidos aniónicos (Ochoa y col., 2001). Los resultados de experimentos de mutagénesis dirigida y unión a lípido, permitieron la identificación de algunos residuos implicados en la interacción del dominio C2 con fosfolípidos aniónicos. En concreto, los resultados de los citados experimentos apuntan a los residuos Trp23, Arg26 y Arg32, localizados en el bucle 1, y a Ile89, situada en el bucle 3, como responsables de la interacción del dominio C2 de la PKC ϵ con membranas modelo (Ochoa y col., 2001; Corbalán-García y col., 2003b) (Figura I.14).

Los datos de la estructura del dominio C2 de la PKC ϵ , muestran además que solamente se conservan dos de los cinco Asp que coordinan los iones Ca^{2+} en el dominio C2 de la PKC α . Concretamente, los residuos de Asp conservados en la PKC ϵ , corresponden a las posiciones 39 y 93, que son homólogas a las ocupadas por los Asp193 y 254 en la PKC α . No obstante, los ensayos de mutagénesis y unión a vesículas, han demostrado que, en la PKC ϵ , el papel de estos residuos (Asp39 y 93), es meramente estructural (Ochoa y col., 2001).

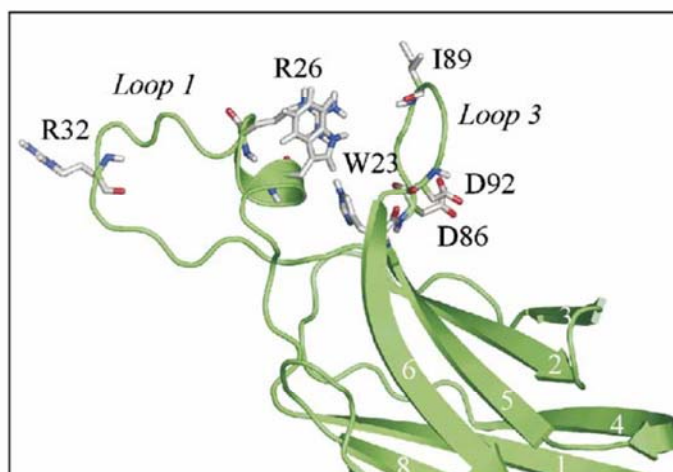


Figura I.14. Modelo estructural del dominio C2 de la PKC ϵ . Se muestran los residuos Trp 23, Arg26, Arg32 e Ile89 que están críticamente implicados en la unión del dominio a fosfolípidos aniónicos. También se detallan las cadenas laterales de otros residuos como Asp86 y Asp92 que no se encuentran implicados en dicha interacción. Tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández (2006).

A la vista de los resultados, se ha propuesto un modelo donde la interacción del dominio C2 de la PKC ϵ con la membrana, se llevaría a cabo gracias a la combinación de fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas, integradas en un mecanismo en dos etapas. Primeramente el bucle 1, establecería una interacción electrostática con los fosfolípidos aniónicos de la membrana, y a continuación se produciría una segunda interacción de tipo hidrofóbico mediada por el bucle 3, y que supondría el anclaje del dominio C2 a la membrana (Ochoa y col., 2001; Corbalán-García y col., 2003b).

La carencia en los dominios C2 de las PKCn, de los residuos que coordinan los iones Ca^{2+} en las PKCc, sugiere la posibilidad de que el dominio C2 de las PKCn, esté constitutivamente estructurado para la unión de lípidos aniónicos, mientras que el de las PKCc, necesite de la asociación a iones Ca^{2+} para estabilizarse antes de su unión a lípido (Newton y Johnson, 1998).

Estudios recientes en células RBL-2H3 transfectadas con el dominio C2 de la PKC ϵ y tras la estimulación con IgE han demostrado que este dominio juega un papel esencial en el anclaje de la proteína a la membrana (López-Andreo y col., 2003). Los residuos del dominio C2 implicados en esta interacción se encontraban localizados en los bucles 1 y 3 del dominio. La combinación de diferentes inhibidores específicos de la familia de la fosfolipasa D y

fosfolipasa C han demostrado que tanto el ácido fosfatídico como el diacilglicerol son necesarios para la localización en la membrana como en la activación de la enzima demostrando así que los dominios C1 y C2 juegan un papel cooperativo en la función de la enzima siendo necesarios para la unión de la PKC ϵ a la membrana (López-Andreo y col., 2003).

En cuanto a la isoenzima PKC δ hay que destacar que estudios recientes llevados a cabo por el grupo de Soltoff y colaboradores (2005) han descubierto que el dominio C2 presenta una inesperada región de unión a fosfotirosina. Este dominio media la asociación de la PKC δ con una proteína transmembrana que se encuentra sobreexpresada en cáncer de colon, la CDCP1. Los resultados de un análisis de una librería de ADN han caracterizado la secuencia consenso del péptido de 13 aminoácidos que interacciona con el dominio C2: (Tyr/Phe) – (Ser/Ala) – (Val/Ile) – **pTyr** – (Gln/Arg)- X – (Tyr/Phe) – X, siendo X cualquier aminoácido. En negrita aparece la Tyr762 que previamente es fosforilada por una proteína Src (Songyang y col., 1995; Yaffe, 2002; Benes y col., 2005) e interacciona con el dominio C2. Con ello se ha descubierto un nuevo modo de unión a pTyr en el cual este motivo de fosfotirosina interacciona a modo de anillo apilado con un residuo de His del dominio C2, en concreto, la His62. Además, se producen otras interacciones de tipo electrostático desempeñadas por los aminoácidos del dominio C2, Arg67 y Lys48, incluyendo además interacciones de tipo van der Waals que implican a dicho anillo. Por otra parte, los residuos Asp60 y Glu123 establecen puentes de hidrógeno directos con dos grupos amida presentes alrededor de esta pTyr, lo que permite la orientación adecuada del residuo de pTyr. El resto del péptido forma varios contactos con la proteína generando una región hidrofóbica pequeña que actúa como una continuación del cuerpo hidrofóbico ente las dos hojas β del dominio C2 δ .

Hay que decir, que la estructura del dominio no se afecta tras la unión de este péptido. Además todo esto sugiere que la fosforilación previamente descrita, en el residuo de Tyr64 en el dominio C2 de la PKC δ (Joseloff y col., 2002) podría estar implicada en la interacción electrostática con Arg67, impidiendo así la unión de fosfopéptidos como el anteriormente descrito. Este modelo se ajustaría bien a lo propuesto por Joseloff y colaboradores (2002), en el cual la fosforilación del dominio C2 de la PKC δ en la Tyr64

producía la inactivación de la enzima en queratinocitos neoplásicos. Sin embargo, cómo se produce la regulación de la fosforilación de estos dominios es un punto que aún no está bien caracterizado.

1.3.3.5. El dominio C2 también se encuentra en otras proteínas diferentes de la PKC.

El dominio C2 se encuentra en una gran diversidad de proteínas, la mayoría de las cuales, se activan dependientemente de iones Ca^{2+} . De hecho y como hemos dicho anteriormente, la primera estructura resuelta de un dominio C2 de topología I, fue la correspondiente al dominio C2A de la sinaptotagmina I, una proteína integral de membrana, sensible a Ca^{2+} , que se encuentra en las vesículas sinápticas (Perin y col., 1990). También existen otros miembros de la familia de las sinaptotagminas que contienen dominios C2 con topología I y presentan un amplio rango de afinidades de unión para el Ca^{2+} incluyendo aquellos que no unen Ca^{2+} (para revisiones Rizo y Sudhof, 1998; Sudhof, 2002; Tucker y Chapman, 2002). En el caso de los dominios C2 de topología II se encuentran el dominio C2 de la PLC δ -1 que, al igual que la sinaptotagmina I, necesita de la presencia de Ca^{2+} para su actuación (Essen y col., 1996). Muchas otras proteínas que participan en la regulación de la liberación de neurotransmisores también tienen uno o varios dominios C2. Éste es el caso de proteínas como Munc-13 (Brose y col., 1995), proteína B/K (Kwon y col., 1996), rabfilina A (Shirataki y col., 1993), familia RIM/NIM (Wang y col., 2000), entre otras. Por otro lado también existen proteínas que contienen dominio C2 tipo II y que unen Ca^{2+} como la fosfolipasa C (Williams y Katan, 1996; Rebecchi y Pentylala, 2000), la fosfolipasa A2 citosólica (Six y Dennis, 2000; Balsinde y Balboa, 2005) y proteínas de la región transmembrana (MCTPs) (Shin y col., 2005). Existen otras proteínas que son también incluidas dentro de este grupo, topología tipo II, pero no unen Ca^{2+} como las Quinasas relacionadas a las PKC (PRKs) (Mukai y Ono, 1994; Palmer y col., 1994) y las fosfoinosítido-3-quininas (PI3Ks) (Walker y col., 1999). Todas ellas se encuentran implicadas en funciones biológicas tales como fosforilación, modificación lipídica, transporte vesicular, ubiquitinación, entre otras.

1.3.3.6. Interacciones intramoleculares entre los dominios C1 y C2 de las PKCs.

Experimentos recientes realizados mediante mutagénesis defienden la hipótesis de que son interacciones de tipo intramolecular las que mantienen a las PKC en una conformación inactiva en estado de reposo. De este modo, lo que se ha demostrado es que la sustitución de un residuo específico induce un aumento de la actividad catalítica de la enzima y, al mismo tiempo, una reducción de su especificidad por fosfolípidos cargados negativamente. Uno de los primeros residuos descritos fue el Asp 55 localizado en el dominio C1A de la PKC α , este residuo aparentemente está implicado en la unión del dominio C1A con alguna parte de la proteína, probablemente el dominio C2, siendo la fosfatidilserina el ligando que facilita, de un modo específico, la interacción intramolecular (Bittova y col., 2001). Posteriormente, experimentos realizados por el grupo de Stubbs y colaboradores (2002) determinaron por primera vez evidencias de interacción entre el dominio C1 y C2 proponiendo que la disociación de esta interacción intramolecular entre estos dos dominios de la región reguladora es la responsable de producir un cambio conformacional tal que produce la activación de la enzima (Bittova y col., 2001).

También existen evidencias de que podría ser la *región rica en lisinas* localizada en el dominio C2 de las PKC γ la que se une al dominio C1A (Ochoa y col., 2002). Por tanto, la cadena lateral del residuo Asp55 en el dominio C1A se colocaría cerca de esta región, mientras que las superficies de naturaleza hidrofóbica correspondientes al sitio de unión del DAG en el dominio C1A y la región de unión de calcio 3 (CBR3) en el dominio C2 estarían en contacto quedando inaccesibles para la unión del ligando (Ochoa y col., 2002). Así, este nuevo modo de actuación, también mostrado por Oancea y Meyer (1998) y posteriormente acreditado en posteriores artículos, muestran que el sitio de unión del DAG en el dominio C1 de varias isoenzimas de la PKC se encuentra inaccesible en la conformación inactiva (Bittova y col., 2001; Bolsover y col., 2003; Corbalán-García y col., 2003a; Schechtman y col., 2004; Stahelin y col., 2004).

Sin embargo, otros resultados apoyan la hipótesis de que el dominio C2, y en concreto la *región rica en lisinas*, es el área que

podría estar interaccionando por sí misma y por tanto las responsables de mantener a la enzima en una conformación inactiva. Así, mutaciones en los residuos de Lys197, Lys299 y Lys 211 por Ala, producen la activación constitutiva de la PKC α reduciendo así su necesidad por Ca²⁺ y fosfatidilserina o PtdIns(4,5)P₂. Además, un modelo computacional reciente basado en el acoplamiento del dominio C1A y la estructura cristalina del dominio C2 de la PKC α sugirieron dos pares de posibles interacciones electrostáticas entre estos dominios: Asp55 (C1A)- Arg252 (C2) y Arg42 (C1A)-Glu 282 (C2) (Stahelin y col., 2005). La mutación de estos residuos por Ala produjo aumentos en la afinidad para unirse a la membrana, en la penetración en monocapa así como en la actividad catalítica de la enzima, sugiriendo por tanto, que aunque estos residuos estén implicados en la interacción intramolecular no son los directamente responsables de la unión a la membrana (Stahelin y col., 2005).

En cuanto a las isoenzimas nuevas de la PKC, se ha propuesto recientemente un modelo de interacción intramolecular ejercida por el dominio C1 para la PKC δ (Stahelin y col., 2004). Así, la mutación en el residuo Glu177 a Ala en el dominio C1A, el cual corresponde al residuo Asp55 en la PKC α , mejora la afinidad de unión a la membrana, así como la activación y la penetración en la monocapa de la PKC δ , reduciendo al mismo tiempo la selectividad por fosfatidilserina (Stahelin y col., 2004). Sin embargo, este efecto no se pudo observar para la otra isoenzima nueva, la PKC ϵ , cuando residuos homólogos se mutaron en los dominios C1A y C1B. Esto sugiere que la disposición 3D de los dominios C1 y C2 difiere en cada una de las isoenzimas (Stahelin y col., 2005). No obstante, Mochly-Rosen y colaboradores (2004) describieron cómo la mutación del Asp86 a Ala en dominio C2 de la PKC ϵ induce una localización más rápida de la enzima a la membrana plasmática (Schechtman y col., 2004). Por tanto, este residuo de Asp podría estar implicado en la interacción intramolecular impidiendo la accesibilidad del sitio de unión de lípidos, el cual se encuentra localizado en otro área del dominio, a la membrana (Schechtman y col., 2004).

1.4. REGIONES CONSERVADAS DE LA REGIÓN CATALÍTICA.

1.4.1. Dominio catalítico.

La familia de quinasas ABC (PKA, PKB/Akt y PKC) tienen en común un dominio quinasa o catalítico conservado con más de un 40% de identidad de secuencia, siendo este porcentaje de homología de un 60% dentro de las PKC (Figura I.15).

Una característica común compartida en esta familia es que poseen tres motivos de fosforilación conservados: el bucle de activación, el motivo de giro y el motivo hidrofóbico. La fosforilación en estos tres motivos es esencial para que la enzima sea catalíticamente activa y pueda así, llevar a cabo la fosforilación de su proteína sustrato. Por tanto, estos motivos regulan, críticamente, la función de la enzima (Figuras I.15 y I.16).

Como ya se comentó anteriormente en el apartado 1.3.1, la función de estos dominios quinasa es regulada alostéricamente por la región reguladora. La autoinhibición, mediante el bloqueo estérico del sitio activo, se lleva a cabo mediante el dominio con homología al sustrato (pseudosustrato) para el caso de las PKA y PKC y un dominio con homología a pleckstrina (PH) para el caso de la PKB.

Una vez activa la enzima, las funciones que se le atribuyen a este dominio son:

1. La unión y orientación del ATP (o GTP) donador del fosfato para formar un complejo con un catión divalente (normalmente Mg^{2+} o Mn^{2+}).
2. La unión y orientación de la proteína sustrato.
3. La transferencia del fosfato- γ del ATP al grupo hidroxilo de los residuos de Ser o Thr del sustrato.

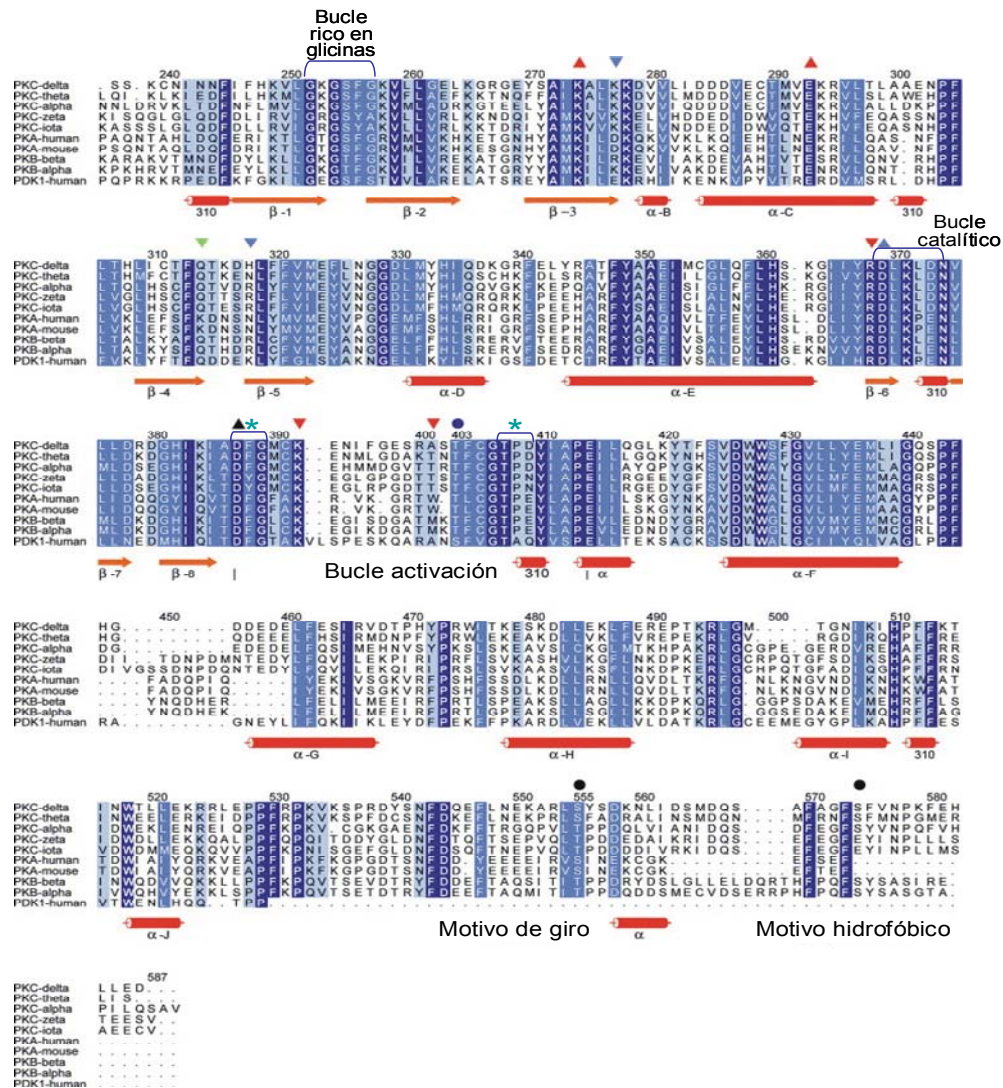


Figura I.15. Alineación del dominio catalítico de las isoenzimas de la PKC: α , δ , θ , ι y ζ ; PKA, PKB- α y PKB- β , y PDK-1. La numeración es en referencia a la isoenzima PKC ι donde la identidad de secuencia de más de un 70% se encuentra marcada en azul oscuro mientras que la homología de menos de un 50% se señala en azul claro. La estructura secundaria común se indican en cilindros para las hélices α (Lóbulo amino terminal) y en flechas para las hojas β (Lóbulo carboxilo terminal). Además, se indican las posiciones correspondientes al bucle rico en glicinas, bucle de activación, motivo de giro y motivo hidrofóbico. También se especifican, con asteriscos de color verde, las dos regiones DFG y TPD altamente conservadas en todas las enzimas. El resto de símbolos corresponden a los sitios de fosforilación (●), los contactos de carácter polar entre el grupo fosfato de la Thr403 (residuo fosforilado en la PKC ι) y los grupos funcionales de la enzima (▼), los contactos polares entre el grupo fosfato de la Thr555 y los grupos funcionales de la enzima (▽), los contactos polares entre el grupo fosfato o el grupo carboxilo de la Ser695 de la PKC θ o residuos relevantes de glutamato o aspartato y grupos funcionales de la enzima (▽), los ligandos de iones Mg²⁺ (▲), el residuo crucial de Asp del sitio activo (▲) y el puente salino encargado de estabilizar la conformación de la hélice α C (▲). Tomado de Messerschmidt y col. (2005).

El primer dominio quinasa resuelto fue el de la PKA con una resolución de 2,7 Å (Knighton y col., 1991). Posteriormente se han resuelto 30 estructuras de dominios catalíticos, como el dominio catalítico de la PKB (Yang y col., 2002). Además, y durante la realización de esta Tesis doctoral, se han resuelto las primeras estructuras de tres dominios catalíticos de las PKC: el dominio catalítico de la isoforma nueva PKC θ (Xu y col., 2004), posteriormente el de la isoforma atípica PKC ι (Messerschmidt y col., 2005) y muy recientemente, el dominio catalítico de la isoforma clásica PKC β II (Grotsky y col., 2006).

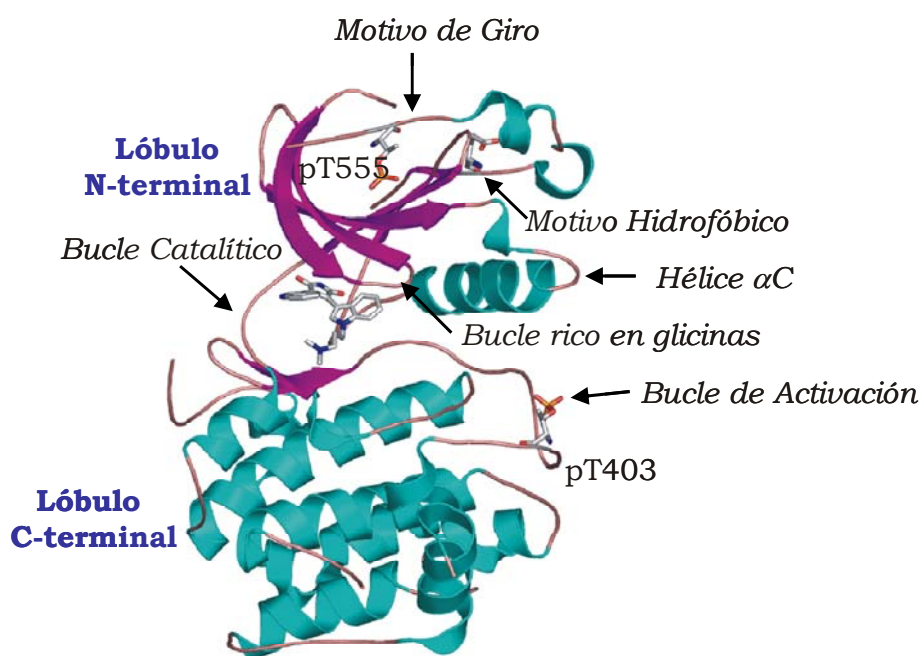


Figura I.16. Modelo estructural del dominio catalítico de la PKC ι acoplado con el inhibidor Bis-(indolil)-maleimida 1 (BIM1). El lóbulo amino terminal aparece en color rosa mientras que el lóbulo carboxilo terminal en color azul. Los residuos de Thr susceptibles de fosforilación, Thr403 en el bucle de activación y Thr555 en el motivo de giro, aparecen en modelo de barras. Estructura realizada utilizando el programa PyMol (DeLano Scientific LLC, San Francisco) tomada previamente del PDB (código 1ZRZ; Messerschmidt y col., 2005). Tomado de Corbalán-García y Gómez-Fernández, (2006).

Esencialmente, la estructura del dominio catalítico está formada por dos lóbulos, un lóbulo amino terminal principalmente compuesto de cadenas β y un lóbulo carboxilo terminal formado, en su mayoría, por hélices α (Taylor y Radzio-Andzelm, 1994; Johnson y Lewis, 2001) (Figura I.16). El surco que queda entre los dos lóbulos es el sitio de unión del ATP y del sustrato. En cuanto a la función que

desempeñan cada uno de los lóbulos, el primero de los lóbulos está implicado en el anclaje y orientación del nucleótido mientras que el segundo es el responsable de la unión del péptido sustrato y de la iniciación de la transferencia del fosfato.

Lóbulo amino terminal: *Bucle rico en glicinas.*

Dentro del lóbulo amino terminal se encuentra una región conservada en todas las quinasas denominada *Bucle rico en glicinas* (Figuras I.15 y I.16) cuya secuencia consenso es: XGXGX₂GX₁₆KX, donde X puede ser cualquier aminoácido, está situado entre las hojas β 1 y β 2 y forma parte del sitio de unión del ATP. Su función consiste en colocar el grupo γ -fosfato del ATP para la transferencia del fosfato.

El grado de conservación del bucle rico en glicinas, en las isoenzimas de la PKC de células humanas, es tal que entre las isoenzimas α y β , la diferencia es únicamente de cuatro aminoácidos y sólo de dos si se comparan las isoenzimas atípicas ι y ζ . La mutación de este sitio de enlace del ATP inhibe por completo la actividad quinasa de la enzima (Ohno y col., 1990).

En el caso de las PKCn, y en concreto el de la PKC θ (Xu y col., 2004), el cristal se obtuvo unido junto con el inhibidor estaurosporina, debido a ello, esta región (GXGXFG) adopta una conformación fija y más cerrada que la que mantienen la PKA y otros complejos quinasa (Johnson y col., 2001). Por ello y en contraste con la PKA, el acceso a los residuos que son cruciales para la actividad catalítica se encuentra, en gran parte, restringido. Por tanto, la unión de la estaurosporina a la PKC θ parece provocar no solo cambios en la orientación del lóbulo sino también cambios en la estructura de este bucle rico en glicinas que aseguran que el sitio de reconocimiento del fosfato se encuentre bloqueado manteniendo una disposición inhibitoria (Xu y col., 2004).

Dentro de las PKCa, la estructura obtenida fue el dominio catalítico de la PKC ι junto con el inhibidor Bis-(indolil)-maleimida 1 (BIM1) donde su modo de actuación es unirse a la región de unión del ATP. Esta región es peculiar en las PKCa ya que en la secuencia consenso GXGX_YA existen dos residuos que no se encuentran en el resto: PKA, PKB/Akt, PKCc y PKCn. Se trata de los residuos de Tyr y Ala en penúltima y última posición en lugar de Phe y Gly como ocurre

en el resto de dominios quinasa. Esto hace que la enzima adopte una conformación abierta y ordenada bien porque la cadena lateral de la Tyr necesite de mucho más espacio en comparación con la Phe o bien, que la Ala haga que este bucle sea más rígido y ordenado en esta conformación abierta.

Lóbulo carboxilo terminal: bucle de activación, motivo hidrofóbico y giro hidrofóbico.

Bucle de activación.

La primera de las tres fosforilaciones ocurre en el denominado bucle de activación, situado a la entrada del sitio activo y cuya fosforilación proporciona un importante mecanismo regulador no sólo en las PKC sino también en el resto de miembros que componen la Familia ABC, es decir también en la PKA y PKB/Akt (Taylor y Radzio-Andzelm, 1994; Johnson y col., 1996; Johnson y Lewis, 2001). En todos los casos parece ser que cuando el residuo de Thr es fosforilado interacciona con dos residuos: un residuo de Arg y uno de Lys localizados en el bucle de activación y cercanos al residuo de Asp, propuesto como la base catalítica (Orr y Newton, 1994b). Estas interacciones iónicas tienen como objetivo la alineación correcta del bucle de activación para permitir la unión del sustrato (Knighton y col., 1991; Taylor y Radzio-Andzelm, 1994; Xu y col., 2004; Messerschmidt y col., 2005)

En este bucle de activación se encuentra la zona de unión del sustrato la cual interviene en la regulación de la especificidad por los sustratos a fosforilar por la PKC. No obstante, en la especificidad de la enzima por el sustrato parece estar además implicado el dominio C1, la región de unión de ATP y la región variable 5 (V5) (Pears y col., 1991).

Por otro lado, en la región donde tiene lugar la fosforilación de los sustratos, aparecen dos regiones altamente conservadas en todos los dominios quinasa, una de ellas es la región TPD (Thr-Pro-Asp) y la otra es la región DFG (Asp-Phe/Tyr-Gly) también conocida como *elemento central de transferencia de fosfato* la cual se mantiene idéntica en todas las isoenzimas humanas de la PKC y en muchas otras quinasas (Kemp y Pearson, 1990; Taylor y col., 1990). Sólo las isoenzimas ι y ζ de la PKC presentan una leve diferencia, que se

caracteriza por la sustitución de la Phe de la secuencia consenso por una Tyr (Ono y col., 1989b). El responsable de la transferencia del grupo fosfato en el DFG es el Trp de la región TPD que está presente en todas las isoenzimas de forma invariable (Figura I.15).

Motivo de giro

Tras la fosforilación del bucle de activación, se produce la rápida fosforilación de otro residuo de Thr (PKCc y PKCn) o Ser (PKCa), situado en el lóbulo amino terminal del dominio. En la mayoría de los casos, este residuo aparece en una zona de la secuencia rica en residuos de Pro, y que según los modelos estructurales, corresponde a un giro de la molécula y por esta razón, se le denomina motivo de giro (Cenni y col., 2002). Además, la secuencia contiene los residuos fosforilables de Thr (PKCc y PKCn) o Ser (PKCa) (Figuras I.15 y I.16).

Motivo hidrofóbico.

El siguiente y último sitio fosforilado es el motivo hidrofóbico. La fosforilación ocurre también en residuos de Ser/Thr y se encuentra rodeado de una secuencia rica en residuos hidrofóbicos de ahí su denominación (Cenni y col., 2002).

Esta región se encuentra menos conservada que el resto, cuya secuencia consenso es: FXXFS/T/E siendo X cualquier aminoácido y en cuyo extremo, dependiendo de la isoenzima, se encuentra el residuo de Ser, Thr o Glu susceptible de fosforilación. Así, mientras que en las PKCc y PKCn aparece una Ser o Thr conservada, en las PKCa aparece un residuo de glutámico que sustituye al residuo de Ser/Thr fosforilable. En este último caso, el residuo de glutámico mimetiza el sitio de fosforilación pero no es tan perfecto como si así lo fuera, ya que el grupo fosfato de la Ser/Thr fosforilada proporciona cuatro sitios donde se pueden establecer enlaces por puentes de hidrógeno mientras que el glutámico tan sólo proporciona dos a través de sus cadenas laterales (Messerschmidt y col., 2005).

Los datos cristalográficos en la PKB así como en las estructuras de la PKC recientemente resueltas han permitido averiguar que el papel estructural del sitio de fosforilación hidrofóbico es reforzar la asociación intramolecular entre el motivo hidrofóbico, presente en el

extremo carboxilo terminal, y la hélice αC , que pertenece al lóbulo amino terminal, para favorecer así la alineación de los residuos de la hélice αC de un modo favorable para su catálisis. (Yang y col., 2002; Xu y col., 2004; Messerschmidt y col., 2005).

1.4.1.1. Regulación del dominio catalítico por fosforilación.

La fosforilación de la PKC es el primer paso que tiene lugar para que tenga lugar la activación de la enzima. Esta fosforilación tiene lugar de forma secuencial en tres residuos de Ser/Thr conservados del dominio catalítico (Ron y Kazanietz, 1999; Cenni y col., 2002) que por su posición en la secuencia de la proteína, se hace referencia a tales fosforilaciones como: fosforilación del bucle de activación, fosforilación del motivo de giro y fosforilación del motivo hidrofóbico (Figuras I.15 y I.16).

Fosforilación del bucle de activación.

El residuo fosforilado de este bucle de activación corresponde a un residuo de Thr que varía en posición dependiendo de la enzima en cuestión. Así, este residuo corresponde a Thr197 en la PKA y Thr308 en la PKB/Akt. En el caso de las PKC, este residuo corresponde a Thr497 para la PKC α (Cazaubon y col., 1994), Thr403 para el caso de la PKC ι y Thr410 para el caso de la PKC ζ . En cualquier caso, esta fosforilación es esencial para que se produzca la correcta alineación del sitio catalítico de la enzima para su activación (Knighton y col., 1991; Keranen y col., 1995; Tsutakawa y col., 1995).

Parece ser que el papel de esta Thr fosforilada es aportar cargas negativas por parte del grupo fosfato. Ya que mutaciones en el residuo de Thr crítico por un residuo neutro y no fosforilable inhibía la actividad, mientras que la mutación de dicho residuo de Thr bien a un residuo de Asp en el caso de la PKA y PKB/Akt o bien a un residuo de Glu en el caso de la PKC, producía una enzima catalíticamente competente, es decir, la mutación no parecía afectar a la funcionalidad de la enzima. Esto podría explicarse considerando que la carga negativa proporcionada por el Asp o Glu, mimetiza el efecto de la aportación del grupo fosfato (Cazaboun y col., 1994; Orr y Newton, 1994b; Newton, 2001). Además, estudios posteriores realizados por el grupo de Liu y colaboradores (2002), han demostrado que en el caso de la PKC θ esta fosforilación es esencial

para la función de la enzima, ya que la sustitución de la Thr por una Ala produjo un descenso en la actividad de 100 veces, demostrándose una vez más que este fosfato tiene un efecto importante sobre la conformación del sitio activo.

En el caso de las PKB y PKC esta fosforilación es llevada a cabo por una quinasa denominada quinasa dependiente de fosfoinosítidos o PDK-1. Sin embargo, en la PKA este sitio es autofosforilable (Yonemoto y col., 1997) de hecho, se ha demostrado que *in vivo*, la PKA no es fosforilada por la PDK-1 (Williams y col., 2000) aunque previamente, *in vitro*, se demostrara que PDK-1 reconocía este bucle de activación (Cheng y col., 1998).

PDK-1 es una enzima constitutivamente activa y es esencial para la función de las PKC, ya que la deficiencia de PDK-1 en células madre genera un descenso importante en sus isoenzimas (Balendran y col., 2000). Esto es consistente con experimentos anteriores donde se demostraba que la enzima era inestable en estado defosforilado (Bornancin y Paker, 1996; Edwards y col., 1999).

Para que tenga lugar la fosforilación por PDK-1 es necesario que sus proteínas sustrato, en nuestro caso la PKC, se encuentren en la posición y conformación correctas. De modo que la PKC es sustrato de PDK-1 cuando se encuentra unida a la membrana y en una conformación abierta en la cual el pseudosustrato no se encuentre ocupando el sitio activo. Para las PKCc, esta fosforilación es un proceso de maduración de la enzima, de modo que la fosforilación por PDK-1 no la activa sino que sólo la convierte en catalíticamente competente. Es posteriormente, en presencia de determinados segundos mensajeros (p.e. diacilglicerol), cuando la PKC se convierte en catalíticamente competente y activa. Por tanto, la fosforilación llevada a cabo por PDK-1 no siempre es dependiente de fosfoinosítido como es en el caso de las PKCc (Sonnenburg y col., 2001).

Dentro de las PKC, esta quinasa puede fosforilar a las isoenzimas clásicas como la PKC α y la PKC β II (Dutil y col., 1998), a las isoenzimas nuevas como la PKC δ y la PKC ϵ (Le Good y col., 1998; Cenni y col., 2002) y a las PKCa como la PKC ζ (Chou y col., 1998; Le Good y col., 1998).

La resolución reciente de la estructura PKC θ corrobora de nuevo que la fosforilación en el bucle de activación, en este caso de la Thr538, junto con la hélice α C, hacen que la estructura se encuentre plegada de una forma apropiada para la unión del sustrato y su catálisis (Xu y col., 2004).

Fosforilación del motivo de giro.

La fosforilación de este motivo es por autofosforilación ya que se produce intramolecularmente con Thr638 para la PKC α (Bornancin y Parker, 1996), con Ser676 para la PKC θ (Xu y col., 2004) y Thr555 para la PKC ι (Messerschmidt y col., 2005).

En la PKA, este residuo corresponde a Ser338, el cual se ancla en la parte superior del lóbulo amino terminal con el residuo de pSer en la parte más alta del giro. La mutación de esta Ser en la PKA desestabiliza el dominio quinasa (Yonemoto y col., 1997), probablemente debido a la pérdida de este anclaje en la parte superior del dominio quinasa. Para el caso de la PKB/Akt, la mutación del residuo equivalente de Thr no causó efecto alguno. Sin embargo, en la PKC β II la mutación de la Thr641 produce la inactivación del dominio quinasa (Edwards y col., 1999).

Con estos estudios estructurales podemos afirmar que la fosforilación en el motivo hidrofóbico, en la PKA y en la PKC, es esencial para la estabilización del dominio quinasa mediante la fijación del extremo carboxilo terminal en la parte superior del lóbulo del centro quinasa.

Además, el motivo de giro podría estar implicado en las interacciones proteína-proteína, y es posible que el estado fosforilado de este motivo de giro, resulte determinante en la regulación de dichas interacciones (Yaffe y col., 1997).

Fosforilación del motivo hidrofóbico.

La fosforilación del motivo hidrofóbico no es esencial en la funcionalidad de la PKC sino que más bien se le atribuye un papel en el mantenimiento de la estabilidad estructural. Así, en la PKC α se ha demostrado que la sustitución del residuo fosforilable Ser por Ala no afecta a la funcionalidad de la enzima, sino que más bien, aumenta la

estabilidad térmica y resulta más susceptible a la actuación de las proteasas (Gysin e Imber, 1996; Bornancin y Parker, 1997; Edwards y Newton, 1997; Gysin e Imber, 1997).

En las PKCc la fosforilación de este motivo, parece deberse a un proceso de autofosforilación (Behn-Krappa y Newton, 1999) pero en las PKCn existe más controversia. Así, mientras unos autores sostienen que la fosforilación se produce intramolecularmente, al igual que en las isoenzimas clásicas (England y col., 2001, Cenni y col., 2002), otros investigadores consideran que en las PKCn, la fosforilación del motivo hidrofóbico, podría estar mediada por una proteína quinasa, que se une a la PKC ζ (Alessi y col., 1997; Ziegler y col., 1999).

En las PKCc y PKCn, una vez que la enzima ha sufrido estas tres fosforilaciones es cuando la enzima alcanza la *maduración*. Esta enzima madura, tras un ligero anclaje a la membrana, se encuentra en el citoplasma y es catalíticamente competente, pero no activa porque se encuentra en estado autoinhibido por el pseudosustrato. La unión posterior a segundos mensajeros presentes en la membrana es el desencadenante de que se produzca la liberación del pseudosustrato del sitio activo adquiriendo la conformación activa. Es en dicha conformación cuando la PKC une sus proteínas sustrato y las fosforila desencadenándose así la cascada de fosforilaciones subsiguientes que conllevan a los procesos celulares ya descritos en este capítulo (Nishizuka, 1995; Toker, 1998; Newton, 2001). Sin embargo, la regulación en las PKCa no está tan clara. Lo único que se sabe es el requerimiento de PDK-1 para el paso de fosforilación (Chou y col., 1998; Le Good y col., 1998), pero las contribuciones de la región pseudosustrato en el proceso de regulación es algo que aún está por esclarecer.

1.5. REGIONES VARIABLES.

En las PKC existen unas regiones variables, en número variable, dependiendo de la isoenzima.

Estas regiones se extienden desde el extremo amino terminal de la cadena aminoacídica y se pueden distinguir hasta 5 regiones a las que se les denomina: V1, V2, V3, V4 y V5.

La función de dichas regiones es muy importante en procesos de regulación y funcionalidad de la PKC.

Así, la región V1 se localiza en el extremo amino terminal y se encuentra presente en todas las isoenzimas con algunas variaciones, que parecen ser importantes en la especificidad de cada isoenzima por los sustratos (Schaap y col., 1990; Pears y col., 1991; Zidovetzki y Lester, 1992). Se ha descrito 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 localización de la enzima después de ser estimuladas por ésteres de forbol (Sossin y Schwartz, 1993). La proteína ENH interacciona a través de la región V1 con la PKC ϵ y la PKC β (Kuroda y col., 1996).

La región V2 aparece únicamente entre las PKC c y PKC n , conectando los dominios C1 y C2. En las PKC a , que carecen de dominio C2, la región V2 está ausente.

La región V3 o región bisagra es una zona muy flexible (Flint y col., 1990) y se encuentra presente en todas las isoenzimas de la PKC conectando la región reguladora y la catalítica de la enzima. Esta región V3 es esencial para la funcionalidad de la proteína, ya que posee una secuencia sensible a la acción de proteasas (tripsina o calpaína) y su ruptura libera a la PKC de la autoinhibición impuesta por el dominio regulador, generando así una enzima activa constitutivamente (Newton y col., 2001).

La región V4 se encuentra en el centro del dominio catalítico, y a continuación, en el extremo carboxilo-terminal de la cadena, se encuentra la región V5.

Esta región V5 es un fragmento de 50 aminoácidos, situado en el extremo carboxilo terminal de la PKC y posee una función reguladora de la actividad PKC, debido quizás a su proximidad con el dominio catalítico (Bornancin y Parker, 1997; Edwards y Newton, 1997) 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). También V5 es determinante en la especificidad de sustrato propia de cada isoenzima. La gran importancia de esta región variable V5 queda reflejada en la PKC β . Esta isoenzima presenta dos isoformas distintas, βI y βII , producidas a partir de un

mismo gen por el procesamiento alternativo del ARN durante el proceso de maduración donde la única diferencia en la secuencia primaria reside en esta región V5. 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).

1.6. REGULACIÓN DE LA PKC.

Además de la regulación por fosforilación y la unión a diferentes cofactores, existen otros factores como las propiedades de la membrana y la interacción con otras proteínas que son importantes en la activación de la PKC.

1.6.1. Regulación por las propiedades de la membrana.

Las membranas biológicas cumplen un papel fundamental en la supervivencia de las células tanto por servir de barrera física como por ser el lugar donde ocurren multitud de procesos bioquímicos. Uno de estos procesos es la activación de un gran número de proteínas entre las que se encuentra la PKC.

Las membranas se encuentran compuestas principalmente por lípidos y proteínas con una participación minoritaria de carbohidatos. Estas componentes se agrupan en una estructura básica de bicapa lipídica, en la que la composición y las propiedades físicas, son muy variables. En este sentido, las propiedades estructurales de la membrana van a ejercer una influencia importante sobre la actividad de la PKC.

Se ha demostrado que algunas características de la membrana resultan especialmente favorables para la activación de la PKC. Entre ellas, se pueden citar: el estado fluido de la misma, su tendencia a formar fases lamelares y la presencia de insaturaciones en las

cadena acílica de sus lípidos componentes (Bolen y Sando, 1992, Epanand, 1998, Jiménez-Monreal y col., 1999, Micol y col., 1999, Torrecillas y col., 2001). Además, la presencia en la membrana de microdominios ricos en fosfatidilserina y diacilglicerol, también parece resultar beneficiosa para la activación de la enzima (Yang y Glaser, 1995, Dibble y col., 1996, Hindeliter y col., 1997).

Otras propiedades de las membranas biológicas, cuya alteración afecta a la activación de la PKC son el grado de curvatura de las mismas y la adición de sustancias del tipo de los anestésicos, los alcoholes o los antineoplásicos, capaces de intercalarse entre los componentes membranales (Slater y col., 1993, 1997, Goldberg y Zidovetzki, 1998, Sánchez-Piñera y col., 1999b).

1.6.2. Regulación por interacción con otras proteínas.

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 interactuar 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).

Una vez que en respuesta a la señal adecuada, la PKC se ha activado y se encuentra asociada a la membrana, la proteína está preparada para fosforilar a sus sustratos. Sin embargo, la promiscuidad de fosforilación que muestra la PKC *in vitro* y la necesidad de la proximidad de los sustratos a la enzima para que ésta los fosforile, indican la necesidad de que exista un mecanismo de interacción PKC-proteína que regule específicamente su unión a los sustratos. Entre las proteínas que intervienen en esta interacción PKC-sustratos, se establecen dos grupos: las proteínas RACK (receptores para la proteína quinasa C activada) y las proteínas STICK (sustratos que interactúan con la proteína quinasa C) (Jaken y Parker, 2000).

Las proteínas RACK, no son sustratos de la PKC, pero se unen a la forma fosforilada activa de la enzima y facilitan su localización en determinadas zonas de las membranas celulares en proximidad a los sustratos de la PKC, favoreciendo de este modo, la fosforilación de los mismos. En su unión a la PKC, las diferentes proteínas RACK actúan selectivamente sobre determinadas isoenzimas (Mochly-Rosen y col., 1991a, Jaken y Parker, 2000). Se ha propuesto un mecanismo de actuación para estas proteínas RACK, según el cual, cuando las proteínas RACK se unen a la forma activa de la PKC, lo hacen en un lugar ocupado por un dominio pseudo-RACK, cuyo desplazamiento por parte de la proteína RACK, favorecería que la PKC fosforile a su sustrato (Mochly-Rosen y Gordon, 1998). Al mismo tiempo que las proteínas RACK regulan la unión PKC-sustrato, la unión de RACK a la PKC podría estar regulada a su vez por otros factores. En relación a esto, recientemente se ha demostrado, que al menos en el caso de la PKC ϵ , la unión a la proteína RACK2, está facilitada por agentes promotores del estado nitrado de esta isoenzima de la PKC (Balafanova y col., 2002).

Por su parte, las proteínas STICK, al igual que las RACK, muestran una actuación específica de isoenzimas, pero a diferencia de éstas, las STICK son sustratos de la PKC, cuya asociación a la enzima está regulada por su estado de fosforilación (Jaken, 1996). Entre las proteínas STICK se incluyen las proteínas MARCK (sustratos de quinasas ricos en alaninas miristoiladas), algunas aducinas y la proteína clon 72 (Chapline y col., 1996, 1998; Fowler y col., 1998a y b; Ron y Kazanietz, 1999). Las proteínas STICK suelen intervenir en procesos de remodelación del citoesqueleto, vinculando la activación de la PKC con cambios rápidos en la morfología celular (Jaken y Parker, 2000). No obstante, la intervención de la PKC en la remodelación del citoesqueleto, no se limita a la mediada por proteínas STICK; sino que la PKC, también se asocia directamente a compartimentos celulares dinámicos como son ciertos elementos del citoesqueleto o las vesículas del Golgi, gracias a la interacción directa que la PKC establece con proteínas que forman parte de dichas estructuras. La actina constituye un caso especial de asociación con la PKC, ya que además de la interacción indirecta PKC-actina mediada por STICK, se ha demostrado, que la F-actina se asocia directamente a las isoenzimas PKC ϵ y β II (Blobe y col., 1996; Pekreris y col., 1996).

Otro caso de interacción PKC-proteínas, lo constituyen las proteínas que se unen simultáneamente a la PKC y a otras proteínas implicadas en señalización celular, lo que facilita la interacción entre distintas rutas de transmisión de señales. A este tipo de proteínas se las conoce como “proteínas soporte” o “proteínas de anclaje” y como ejemplo de las mismas se puede citar a la proteína AKAP79, que interacciona simultáneamente con la PKC y con la proteína quinasa A (PKA), coordinando las actividades de ambas (Jaken y Parker, 2000).

Recientemente, se ha confirmado que las proteínas RACK, actúan en algunos casos como “proteínas soporte”. En este sentido, está demostrado que la proteína RACK1 media la interacción de la PKC ϵ con el regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y con las integrinas, lo que pone de manifiesto un nuevo mecanismo que relaciona la activación de la PKC, con la adhesión y motilidad celular mediada por integrinas (Besson y col., 2002; Liedtke y col., 2002).

Las chaperonas se unen a las PKC para aumentar el tiempo de vida media. Así, la PKC, una vez activa y por tanto, anclada a la membrana es considerablemente más susceptible de ser defosforilada (dos órdenes de magnitud) que cuando se encuentra en estado soluble (Dutil y col., 1994). En estado defosforilado es sensible a degradación, presumiblemente por proteólisis vía ubiquitinación (Lee y col., 1997; Lu y col., 1998). La unión de la chaperona Hsp70 estabiliza a la PKC y permite que sea de nuevo fosforilada evitando así su degradación (Gao y Newton, 2002). Por tanto, el motivo de giro es esencial ya que no sólo participa en el proceso de maduración de estas quinasas sino que también desempeña un papel protector frente a las tensiones conformacionales que tienen lugar durante la señalización celular.

El lugar de la interacción PKC-proteína varía según la isoenzima de la PKC y la proteína con la que se establezca dicha interacción. En algunos casos, la porción de la PKC que media en la interacción, es la región reguladora, y en otros, es el dominio catalítico (Newton, 2001). Como ejemplos de esta variabilidad, encontramos que la PKC ϵ interacciona con la proteína RACK2 a través de la región variable 1 (V1) (Csukai y col, 1997), mientras que es el dominio C1 de esta misma isoenzima el que establece su interacción con la F-actina (Prekeris y col., 1996, 1998). Sin embargo,

la interacción de la F-actina con la PKC β II se produce a través de la región variable 5 (V5) de su dominio catalítico (Blobe y col., 1996).

1.7. ACTIVACIÓN DE LA PKC.

1.7.1. Rutas de activación.

La activación de la PKC se produce como consecuencia de la llegada a la célula de ciertas señales que estimulan los receptores de la superficie de la membrana.

La principal ruta de activación de las PKC α y PKC δ , es la mediada por la fosfolipasa C (PLC). Cuando los receptores de la membrana estimulados, están acoplados a proteínas G, se activa la PLC de tipo β , mientras que si son los receptores tirosina quinasa (TKR) los que se estimulan, la PLC activada es de tipo γ . Independientemente de la isoenzima de la PLC que se active, cataliza la hidrólisis del PtdIns(4,5)P₂ (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) de la membrana, para generar DAG (1,2 *sn*-diacilglicerol) e Ins-1,4,5-P₃ (inositol-1,4,5-trisfosfato) (Parker, 1999; Swannie y col., 2002) (Figura I.17).

El DAG sintetizado, se mantiene en la membrana donde, además de activar por sí mismo a las PKC α y PKC δ , actúa como precursor de otros compuestos lipídicos capaces de activar a la enzima. Por su parte, el Ins-1,4,5-P₃ interviene solamente en la activación de las isoenzimas clásicas de PKC, y además de forma indirecta, ya que en su actuación, provoca la liberación de iones Ca²⁺ desde los reservorios intracelulares al citoplasma. Como resultado de la actuación del Ins-1,4,5-P₃, la concentración de Ca²⁺ libre en el citoplasma, llega a aumentar hasta 100 veces, pasando de 10⁻⁸ M a 10⁻⁶ M (Nishizuka, 1995).

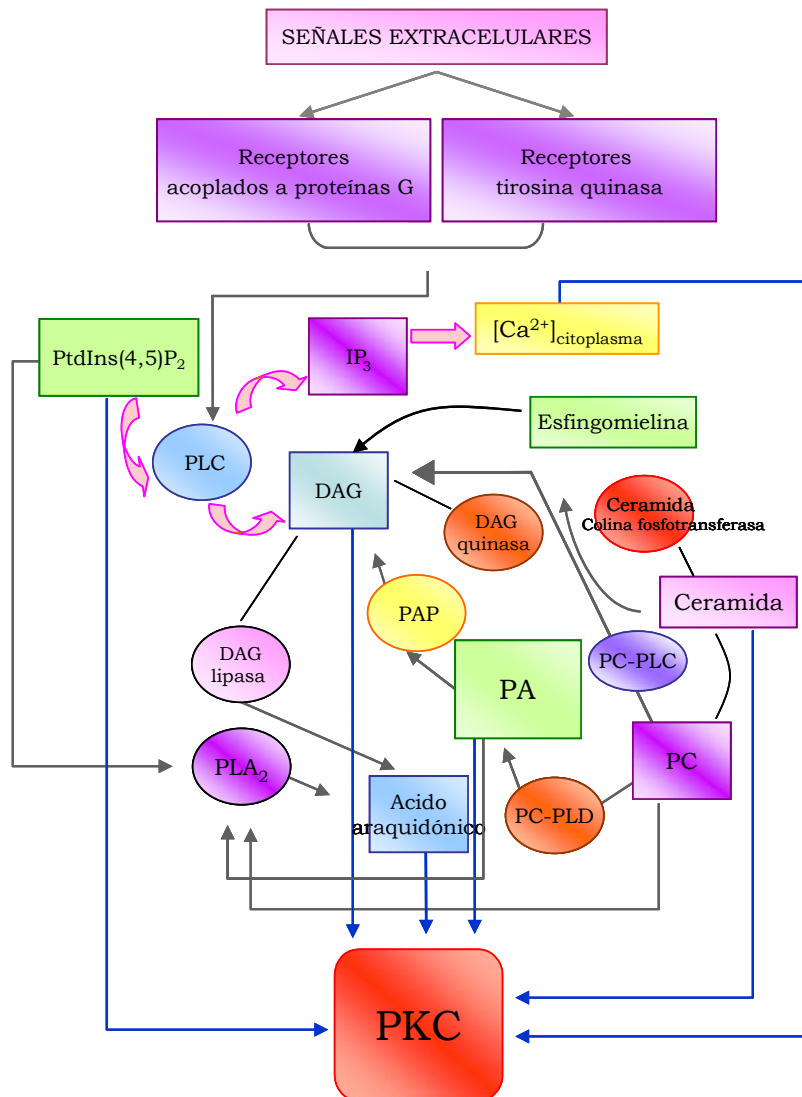


Figura I.17. Diagrama esquemático de las rutas de activación de la PKC. La vía principal de activación de la PKC, es la mediada por la PLC, que aparece indicada en el esquema con las flechas rosas. En el diagrama se representan las reacciones conducentes a la síntesis de los activadores de la PKC, junto con algunas de las enzimas que catalizan dichas reacciones. Los activadores de la PKC considerados en el esquema (PtdIns(4,5)P₂, DAG, PA, AA, ceramida, e iones Ca²⁺), aparecen conectados con el recuadro indicativo de la enzima mediante flechas de color azul.

Existen otras rutas alternativas que, aunque en menor grado que la mediada por la PLC, parecen contribuir a la activación de la PKC, permitiendo que ésta mantenga su estado activo durante un cierto periodo de tiempo, gracias principalmente a la síntesis continua de DAG. En estas vías de activación secundarias, la fosfatidilcolina (PC) presente en la membrana desempeña un papel importante ya que se pueden establecer al menos tres vías distintas

conducentes a la síntesis de DAG a partir de la PC. La contribución de la PC a la activación de la PKC es por un lado, resultado de la actuación de la fosfolipasa D (PLD), que partiendo de PC, genera colina y ácido fosfatídico (PA). El ácido fosfatídico además de ser en sí mismo un activador de la PKC, se transforma en DAG por la acción de la fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP). Esta reacción puede invertirse gracias a la actuación de la DAG quinasa, sintetizándose PA a partir de DAG (Murthy y Mackhlouf, 1995; Mackhlouf y Murthy, 1997; Alcón y col., 2002).

Por otro lado, la formación de esfingomiélin a partiendo de ceramida, implica la transformación de PC en DAG, gracias a la intervención de la enzima ceramida colinafosfotransferasa. Además, la propia ceramida es un activador de la PKC (Wakelam, 1998; Kashiwagi y col., 2002) (Figura 1.17).

Por último, una tercera vía de síntesis de DAG a partir de PC, es la catalizada por la PLC específica de fosfatidilcolina (PC-PLC). Además de activar a la PKC vía DAG, tanto la PC como el PA, o los fosfatidilinositoles presentes en la membrana, pueden actuar como sustrato de la PLA₂ para la producción de ácido araquidónico, cuya intervención en la activación de la PKC, está ampliamente documentada. El DAG, también puede actuar como precursor del ácido araquidónico, como resultado de la actuación de la DAG lipasa (Axelrod, 1990; Mackhlouf y Murthy, 1997; O'Flaherty y col., 2001) (Figura I.17).

1.7.2. Modelo de activación de la PKC.

La PKC recién sintetizada se encuentra en el citoplasma en estado soluble e inactivo (Figura I.18A). Para su activación, es necesaria además de la fosforilación por otra quinasa, PDK-1, la unión a la membrana. El modelo de activación que mejor se conoce es el de las PKC_c que es el que se describe a continuación.

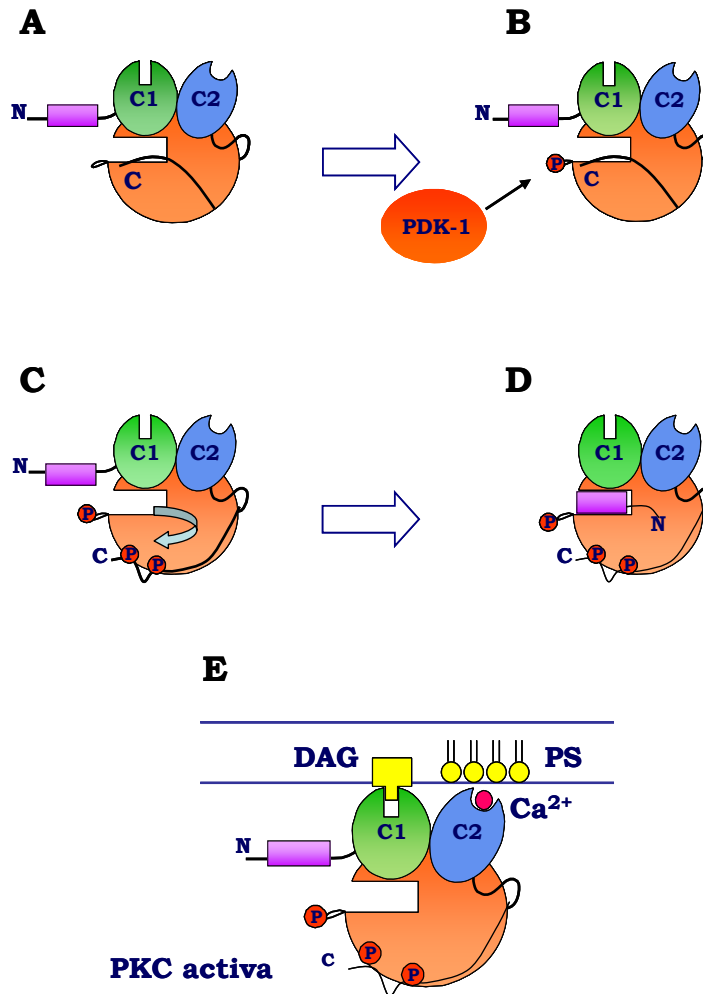


Figura I.18 Modelo de activación de la PKC. (a) La enzima recién sintetizada, es soluble en el citoplasma en una conformación "cerrada". (b) El pseudosustrato se libera del sitio catalítico que queda accesible a la fosforilación por la PDK-1. (c) Tras fosforilar el bucle de activación, la PDK-1 se disocia de la PKC, produciéndose a continuación, dos autofosforilaciones (en el motivo de giro y en el motivo hidrofóbico). (d) El pseudosustrato vuelve a ocupar su lugar en el sitio catalítico en la enzima, ahora catalíticamente competente. (e) La estimulación de ciertos receptores provoca la síntesis de DAG en la membrana y el aumento de los niveles de Ca^{2+} libre en el citoplasma. El dominio C2 se asocia a iones Ca^{2+} . El dominio C2 unido a Ca^{2+} interacciona con la PS de la membrana. El enlace del dominio C2 a la PS, rompe las interacciones con el dominio C1, posibilitando su unión al DAG de la membrana. Por su parte, el pseudosustrato se encuentra nuevamente fuera del sitio catalítico. La PKC es ahora catalíticamente competente y activa, y está capacitada para fosforilar a sus sustratos. Las interacciones que establece la PKC con otras proteínas, aseguran la correcta localización de la enzima a lo largo de todo el proceso de activación descrito. Alternativamente a la asociación del dominio C2 a la PS, en la isoenzima PKC α , se ha descrito que el dominio C2 unido a iones Ca^{2+} , puede interaccionar con el PtdIns(4,5)P $_2$ de la membrana a través de la *región rica en lisinas* (Corbalán-García y col., 2003a; Marín-Vicente y col., 2005).

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, donde se encuentra el residuo de Thr a fosforilar. PDK-1 tras su actuación, se disocia de la enzima (Figura I.18B). Dicha transfosforilación permite que ocurran a continuación dos autofosforilaciones en el extremo carboxilo terminal de la cadena, concretamente en el motivo de giro y en el motivo hidrofóbico (Figura I.18C). La fosforilación del motivo de giro, contribuye a posicionar el extremo carboxilo terminal de la cadena lejos del sitio catalítico, lo que favorece que el pseudosustrato vuelva a unirse al sitio activo. Esta situación supone que la PKC se encuentre en un estado inactivo pero catalíticamente competente ya que no puede desempeñar su función por el bloqueo ejercido por el pseudosustrato (Figura I.18D) (Behn-Krappa y Newton, 1999; Dutil y Newton, 2000; Gao y col., 2001; Newton, 2003).

La estimulación de ciertos receptores celulares, induce la síntesis de DAG en la membrana y el aumento de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} . En esta situación, el dominio C2 se asocia a iones Ca^{2+} , lo que posibilita su interacción con la POPS de la membrana (Medkova y Cho, 1998b; Verdaguer y col., 1999; Newton, 2001; Bolsover y col., 2003). La unión del C2 a iones Ca^{2+} y PS, supone la ruptura de las interacciones con el dominio C1, que es ahora capaz de acceder al DAG de la membrana. El pseudosustrato por su parte, está nuevamente fuera del sitio catalítico (Mosior y McLaughlin, 1991; Orr y Newton, 1994a; Oancea y Meyer, 1998; Slater y col., 2002; Newton, 2003) (Figura I.18E).

En este punto del proceso, la PKC se encuentra en un estado catalíticamente competente y activo, adecuado para fosforilar a sus sustratos.

1.8 FUNCIONES DE LA PKC.

La PKC, una vez activa, está implicada en la transducción de señales extracelulares produciendo gran variedad de efectos sobre distintos procesos celulares en función de las proteínas sustrato a las que fosforile y por tanto active. Estos efectos pueden ser a nivel celular o 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).

Como hemos dicho anteriormente, la región de la PKC encargada de la unión de los sustratos está muy conservada en todas las isoenzimas y se trata del dominio catalítico. Sin embargo, a pesar del elevado grado de conservación en la secuencia de unión al sustrato, no todos los sustratos de las PKC son reconocidos como tales por la totalidad de isoenzimas, sino que entre las PKC, existen preferencias por la fosforilación de sus sustratos. En este sentido, está demostrado que las PKC α fosforilan histonas más eficientemente que las isoenzimas nuevas. No obstante, la especificidad por los sustratos no se reduce a cada clase de isoenzimas, sino que incluso dentro de una misma clase, cada isoenzima fosforila sus propios sustratos (Schaap y Parker, 1990; Olivier y Parker, 1991; Dekker y col., 1993).

Todas las proteínas sustrato de la PKC comparten una misma secuencia que es reconocida por la enzima. Mediante la utilización de péptidos sintéticos se ha podido determinar esta secuencia consenso de fosforilación y que se representa como: RXX**S**/TXRX, donde S y T son los residuos de Ser o Thr a fosforilar por la PKC, R representa residuos de Arg y X puede ser cualquier aminoácido. Esto permite una cierta variedad de posibles sustratos lo que explicaría el amplio rango de actuaciones desempeñadas por la PKC dentro de la célula (Nishikawa y col., 1997) (ver [Figura I.2](#)).

Además de esta secuencia sustrato conservada, debe existir un mecanismo de reconocimiento altamente regulado en el que estén implicados otros factores que expliquen la alta especificidad que muestran las distintas isoenzimas. Resultados de algunos experimentos, han implicado otras regiones de la enzima en el reconocimiento de los sustratos por parte de la PKC como el dominio C1 y la región variable V5 (Pears y col., 1991). También parecen resultar importantes para la especificidad de sustrato, las interacciones de la PKC con otras proteínas encargadas de situar a la enzima en el entorno adecuado para la fosforilación de determinados sustratos (Jaken y Parker, 2000).

Las MARCK son proteínas miristoiladas 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 (Uberall 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; 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 interactuar 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 Ca²⁺ 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 43 kDa 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-quinasas 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).

2. OBJETIVOS.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo profundizar en el conocimiento de los mecanismos que determinan la funcionalidad de la PKC mediante la actuación de sus dominios reguladores C1 y C2 y de su dominio catalítico. El estudio abarca a los dominios C2 de las PKCc representada por la isoenzima α y de las PKCn representada por la isoenzima ε . Además, en el caso de los dominios C1 hemos estudiado distintas isoenzimas clásicas (α y γ) y nuevas (δ y ϵ). Por último, también hemos estudiado el dominio catalítico de la isoenzima atípica PKC ζ .

En el caso del dominio C2 de la PKC α se conoce la existencia de una nueva zona de unión a la membrana denominada *región rica en lisinas* que está implicada en el reconocimiento específico de PtdIns(4,5)P₂. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares de interacción a PtdIns(4,5)P₂ así como el efecto de determinadas mutaciones en la *región rica en lisinas* en dicha interacción.

Por otro lado, el dominio C2 de la PKC ε , es un dominio que une ácido fosfatídico (POPA) con alta afinidad. Sin embargo, no se sabe cómo se afecta la conformación del ácido fosfatídico y en qué medida cuando interacciona con este dominio.

Asimismo, los dominios C1 ejercen una función muy importante en el reconocimiento del diacilglicerol en la membrana lo que facilita, junto con el dominio C2, el anclaje de la proteína en la bicapa lipídica. Pese a todo, se desconoce la afinidad diferencial que pueden presentar estos dominios por diferentes tipos de lípidos negativos así como por distintas clases de diacilgliceroles.

Por último, el dominio catalítico de la PKC ζ es un dominio cuya estructura 3D se desconoce, así como el efecto de la unión de determinados ligandos a dicha estructura.

Por ello, los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

1. Conocer mediante calorimetría de titulación isotérmica y espectroscopía de fluorescencia, los mecanismos moleculares de interacción del dominio C2 de la PKC α a PtdIns(4,5)P₂ (número de moléculas de PtdIns(4,5)P₂ implicadas, grado de afinidad por PtdIns(4,5)P₂) además de estudiar la especificidad por otros fosfatidilinositoles distintos del PtdIns(4,5)P₂. Estudiar el efecto de distintas mutaciones en la *región rica en lisinas* en la unión de calcio y PtdIns(4,5)P₂.
2. Estudiar mediante resonancia magnética nuclear, calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía de infrarrojo cómo se afecta el lípido POPA, en conformación y reorganización, en el proceso de interacción del POPA y el dominio C2 ϵ .
3. Estudiar mediante espectroscopía de fluorescencia la afinidad de unión de diferentes dominios C1, pertenecientes a las subfamilias clásicas y nuevas, a diferentes fosfolípidos negativos y a distintos tipos de diacilgliceroles.
4. Estudiar mediante espectroscopía de IR uni- y bidimensional, la estructura secundaria en disolución del dominio catalítico de la PKC ζ , así como el efecto sobre dicha estructura de la unión de diferentes sustratos y su comportamiento cuando se produce la desnaturalización térmica.

1. MÉTODOS GENERALES.

1.1. OBTENCIÓN DE LOS DOMINIOS C2 DE LA PKC α Y PKC ϵ .

1.1.1. Construcción de los plásmidos de expresión.

Los ADN copia de la PKC α y de la PKC ϵ proceden del laboratorio de los Drs. Nishizuka y Ono (Universidad de Kobe, Kobe, Japón).

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

1.1.1.1. Amplificación mediante la técnica de PCR y digestión de los fragmentos de ADN correspondientes a los dominios C2 de la PKC α y de la PKC ϵ .

El fragmento de ADN correspondiente al dominio C2 de la PKC α , formado por los residuos aminoacídicos comprendidos entre el 158 y 285, se amplificó mediante la técnica de PCR con los oligonucleótidos de secuencias:

5'-CAAGAATTCAAGAGGGGGCGGATTTAC-3' y
5'-CAAAAGCTTGTATTCACCCTCCTCTTG-3'

que amplificaban los extremos 3' y 5' respectivamente (Corbalán-García y col., 1999).

Así mismo, la amplificación de la región comprendida entre los aminoácidos 1-134, correspondiente al dominio C2 de la PKC ϵ , se amplificó con los oligonucleótidos de secuencias:

5'-GCCGGATCCATGGTAGTGTTTC-3' y
5'-GTTAAGCTTTCAGCCCGATGATCC-3'

que correspondían a los extremos 3' y 5' respectivamente (García-García y col., 2001).

Los diferentes mutantes utilizados, del dominio C2 de la PKC α y del dominio C2 de la PKC ϵ , se obtuvieron mediante mutagénesis

dirigida (Saiki y col., 1988) usando el kit comercial QuikChange®XL (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, Estados Unidos).

Así, para el caso del dominio C2 de la PKC α el mutante implicado en la *región de unión de calcio* D246N/D248N se obtuvo mediante la sustitución de dos de los residuos de Asp por dos residuos de Asn en tales posiciones y del mismo modo, los mutantes de la denominada *región rica en lisinas*: K197A/K199A y K209A/K211A se obtuvieron mediante el mismo procedimiento donde dos de los residuos de Lys fueron sustituidos por dos residuos de Ala en las posiciones indicadas.

Del mismo modo, para el caso del dominio C2 de la PKC ϵ , el triple mutante del bucle 1: W23A/R26A/R32A, se obtuvo mediante la sustitución de un residuo de Trp y dos de Arg por tres residuos de Ala en tales posiciones.

Los fragmentos obtenidos por PCR se sometieron a digestión con diferentes enzimas de restricción dependiendo del dominio a clonar. Así, mientras que el dominio C2 α se digirió con EcoRI y HindIII obteniéndose un fragmento de 381 pb, el dominio C2 ϵ se digirió con BamHI y HindIII siendo el fragmento de 399 pb (todas las enzimas se obtuvieron de Roche Diagnostics GmbH, Alemania).

1.1.1.2. Corte del vector de expresión.

Se utilizó el vector de expresión bacteriana pET-28c(+) (Novagen Inc. WI, Estados Unidos). Básicamente, el vector está compuesto de un origen de replicación (ori), un gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el gen que codifica el represor de lac (lacI), un promotor de la transcripción (f1) al que se une el represor lacI, una secuencia que codifica para un tallo compuesto por 6 residuos de histidina y al que se le fusiona el dominio C2 permitiendo así su purificación, un sitio de unión a trombina y los sitios de corte de las enzimas de restricción dentro de una región con múltiples secuencias de corte (Figura II.1).

El plásmido Pet-28c(+) se cortó con las mismas enzimas de restricción que los fragmentos de ADN clonados, es decir con EcoRI y HindIII para el caso del dominio C2 α y BamHI y HindIII para el caso del dominio C2 ϵ . Posteriormente, dichos plásmidos se sometieron a

un tratamiento con fosfatasa (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) que elimina los grupos fosfato de los extremos 5' evitando así la posible religación del plásmido sin el inserto de interés.

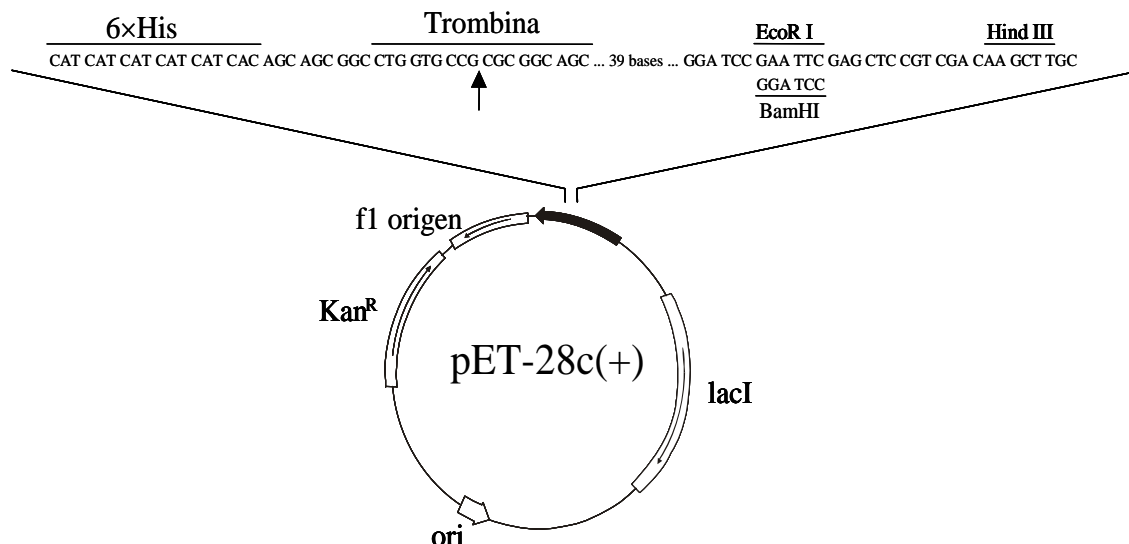


Figura II.1. Esquema del plásmido pET-28c(+). Está compuesto por el promotor de la transcripción f1, un gen regulador del promotor que codifica para el represor de lac (lacI), un sitio de origen de replicación (ori), un gen de resistencia a kanamicina, una secuencia que codifica para un tallo de 6 histidinas (6xHis) y a la que se fusionó el dominio C2, un sitio con múltiples secuencias de corte para enzimas de restricción, entre las que destacan las secuencias que reconocen EcoRI y HindIII, y un sitio de unión a trombina.

1.1.1.3. Ligación del vector de expresión y el fragmento de ADN.

La reacción de ligación del fragmento amplificado por PCR con el plásmido de expresión se llevó a cabo mediante la ligasa T4 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), durante 16 h a 16°C.

1.1.1.4. Selección de los plásmidos que han incorporado el fragmento de ADN.

Los plásmidos que contenían el fragmento de ADN amplificado por PCR se seleccionaron mediante transformación en células DH5 α de *Escherichia coli* utilizando el protocolo propuesto por Cohen y col., (1973). De la placa resultante se seleccionaron 12 colonias y se crecieron en agitación en unos 5 ml de medio LB y en presencia del antibiótico kanamicina 50 μ g/ml durante 16 h a 37°C. A continuación, los cultivos bacterianos se centrifugaron (7.000 rpm, 10 min) con el fin de sedimentar las células, descartándose así los sobrenadantes. La purificación del ADN plasmídico se realizó

mediante el protocolo de lisis alcalina propuesto por Birnboim y Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981).

Por último, se seleccionaron las colonias que presentaban el inserto de interés. Para ello, se sometió a digestión el ADN plasmídico con las mismas enzimas de restricción, EcoRI y HindIII para el dominio C2 α y BamHI y HindIII para el dominio C2 ϵ , y posteriormente, mediante un gel de agarosa, se determinaron los tamaños de los fragmentos resultantes. 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 381 pb ó 399 pb, debidas a los dominios C2 α o C2 ϵ respectivamente. Los plásmidos que no incorporaron el fragmento amplificado por PCR sólo presentaron una banda de un tamaño aproximado de 5 Kb. Finalmente, el ADN plasmídico que incorporó el fragmento de interés se utilizó para transformar nuevas cepas de *E. coli* donde se expresarían las proteínas.

Todos los plásmidos de expresión obtenidos se confirmaron por secuenciación de ADN en el Laboratorio integrado de Biología Molecular del Servicio de apoyo a la investigación (SAI) de la Universidad de Murcia.

Este proceso se encuentra detallado en la [Figura II.2](#).

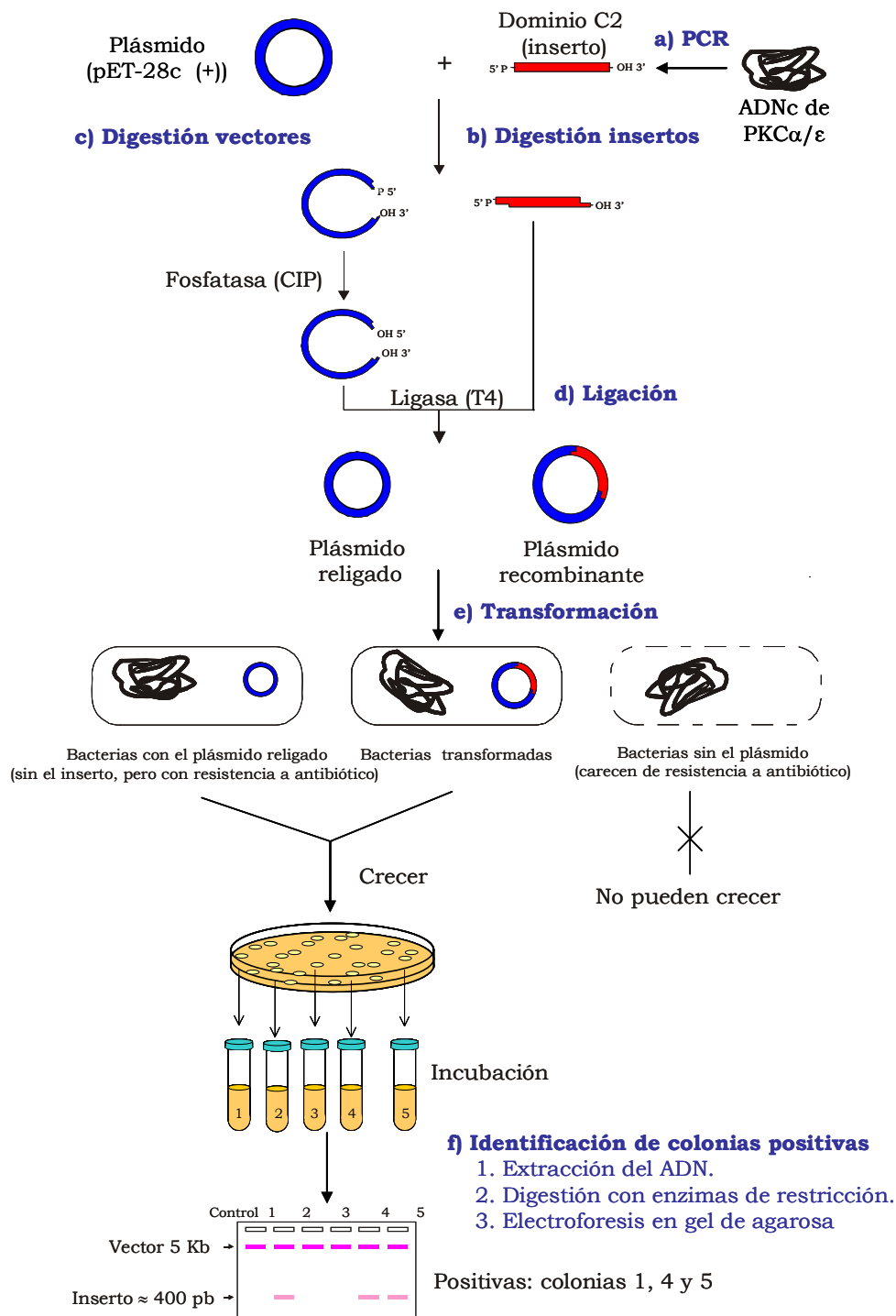


Figura II.2. Esquema de la construcción de plásmidos de expresión. El fragmento de ADN y el plásmido utilizado se cortan con las enzimas de restricción correspondientes a cada dominio (C2 α : EcoRI y HindIII; C2 ϵ : BamHI y HindIII) y se ligan con ligasa T4. Después de la transformación de células competentes 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 aproximadamente unas 400 pb.

1.1.2. Expresión y purificación de los dominios 6xHis-C2 de la PKC α y de la PKC ϵ .

Para expresar las proteínas de fusión 6xHis-C2-PKC α o 6xHis-C2-PKC ϵ y los diferentes mutantes se utilizaron las células transformadas BL21 (DE3) de *E. coli*, con las que se inoculó el cultivo de 1 L de medio LB con kanamicina (50 μ 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. Una vez alcanzada dicha absorbancia, se indujo la expresión de proteína mediante la adición de 0,5 mM de isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) al cultivo durante 6 h a 30°C.

Pasado este tiempo, el cultivo se centrifugó a 7.000 rpm 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 μ g/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). El tampón de lisis para la purificación del dominio C2 de la PKC α contenía: Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 400 mM mientras que para el dominio C2 de la PKC ϵ contenía: Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM.

Posteriormente, las células se lisaron mediante ultrasonidos (10 ciclos x 10 seg) y la suspensión resultante se volvió a centrifugar (14.000 rpm, 30 min, 4°C).

El sobrenadante resultante se pasó por una columna de resina de níquel, His-Gravi TrapTM® (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia), que previamente había sido equilibrada en el mismo tampón anterior desprovisto de inhibidores. Esta columna contiene una resina de alta afinidad por el tallo de 6xHis. A continuación, y antes de eluir, se lavó la columna con 10 ml de tampón de lisis con imidazol 20 mM (Calbiochem, Alemania) para eliminar, en parte, las proteínas inespecíficas unidas. La elución se realizó con concentraciones crecientes de imidazol (6, 6 y 4 ml de 50, 250 y 500 mM de imidazol respectivamente) y se recogieron fracciones de 1 ml. Las fracciones con proteína de fusión se comprobaron mediante tinción con azul Coomassie en un gel SDS-PAGE (15 % gel separador).

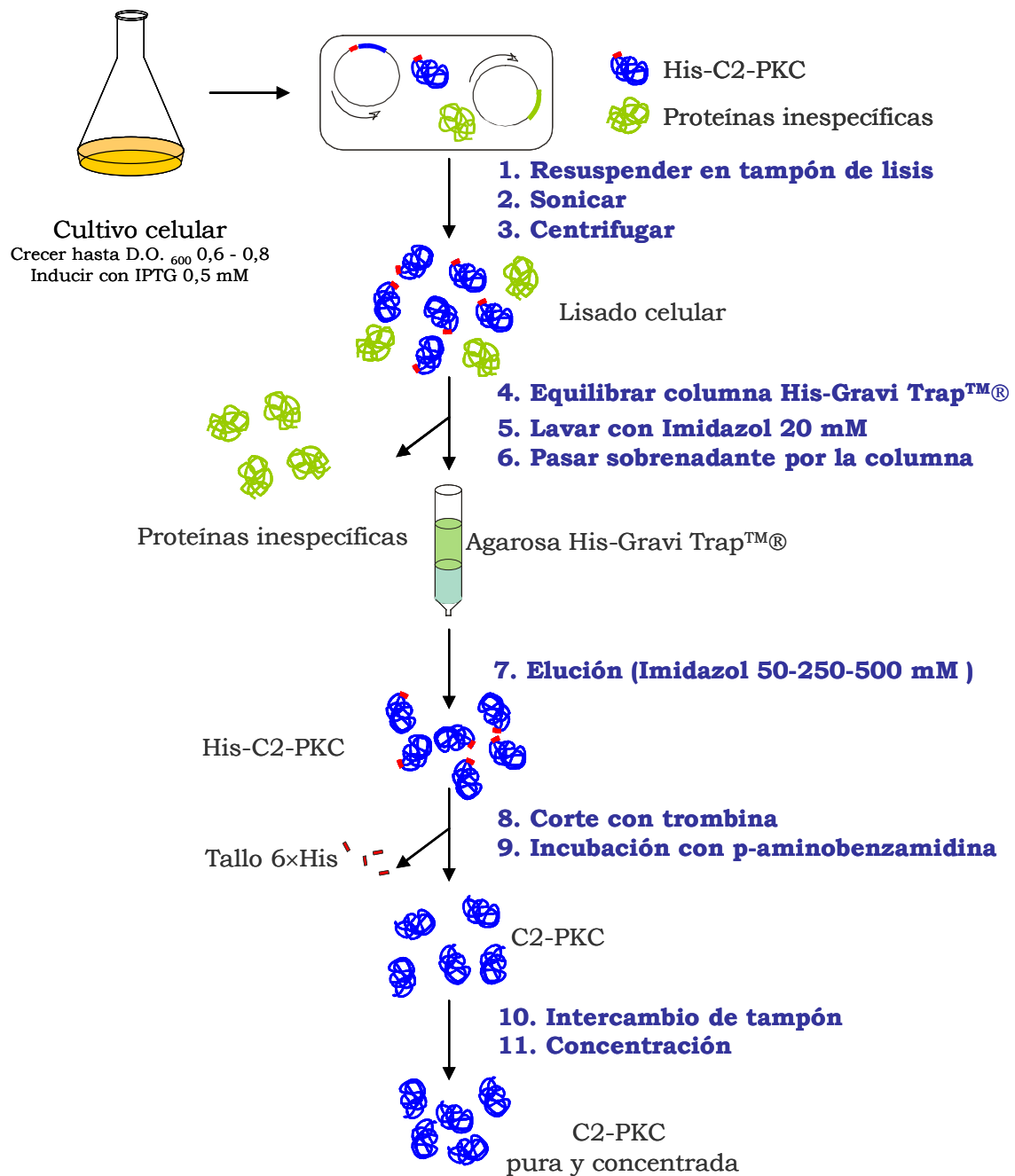


Figura II.3. Esquema del proceso de purificación del dominio C2 de la PKC α . Tras expresar la proteína en un cultivo bacteriano, las células se lisaron y después de eliminar el material insoluble por centrifugación, el lisado celular se incubó con la columna His-Gravi Trap™, de alta afinidad por el 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-aminobenzamidina, se intercambiò el tampón de la proteína y se concentró en una unidad de filtración.

Las fracciones con proteína pura se mezclaron e incubaron con trombina 0,001 U/ μ g proteína (Sigma) durante 1,5 h a temperatura ambiente para cortar el tallo de 6xHis. A continuación y para eliminar la trombina, la disolución se incubó durante 30 min a 4°C con 30 μ l de resina de p-aminobenzamidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos). Tras desechar la resina por centrifugación, el tampón presente en la disolución se intercambi6 con tamp6n de l6sis para eliminar el imidazol. Paralelamente al proceso de eliminaci6n del imidazol, tambi6n se disminuy6 la concentraci6n de NaCl de 400 mM a 100 mM (dominio C2 α) o se intercambi6 el tipo de sal (dominio C2 ϵ), de manera que la prote6na se congel6 en presencia 10% glicerol (v/v) en un tamp6n compuesto por Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM 6 Hepes 25 mM (pH 7,4) y KCl 10 mM, respectivamente. Para ello, se utilizaron unidades de filtro de centrifuga Ultrafree-5 (Millipore Inc., Bedford, MA, Estados Unidos). La pureza de la prote6na se verific6 mediante la tinci6n de plata de un gel de poliacrilamida-SDS (15% gel separador) (v6ase apartado 1.5) y su concentraci6n se calcul6 por el m6todo del 6cido bicinconi6nico (Smith y col, 1985) (v6ase apartado 1.4). La prote6na se conserv6 a -80°C en presencia de glicerol 10% (v/v).

El esquema del proceso de purificaci6n de las prote6nas de fusi6n 6XHis-C2 PKC α y 6XHis-C2-PKC ϵ est6 representado en el esquema de la [Figura II.3](#).

1.2. OBTENCI6N DEL DOMINIO CATAL6TICO DE LA PKC ζ .

El ADN copia de la PKC ζ procede del laboratorio de los Drs. Nishizuka y Ono (Universidad de Kobe, Kobe, Jap6n).

1.2.1. Construcci6n del baculovirus recombinante.

Este sistema se ha utilizado recientemente para la expresi6n de genes heter6logos en cultivos de c6lulas y larvas de insecto. Los genes heter6logos 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 infecci6n tard6as. En muchos casos, las prote6nas 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* (Sf9) o *Trichoplusia ni* (Tn1), 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-HTb (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos) se utiliza para expresar proteínas con un tallo de 6 histidinas (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 bácmido 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.

1.2.1.1. Inserción del gen del dominio catalítico de la PKC ζ en el vector de expresión.

El gen del dominio catalítico de la PKC ζ 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 XhoI 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.4).

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 (véase apartado 1.1.1.4). Las colonias positivas se identificaron mediante el análisis por digestión con las enzimas de restricción XhoI y KpnI del ADN plasmídico aislado de las células crecidas en placa, tal y como se explicó anteriormente.

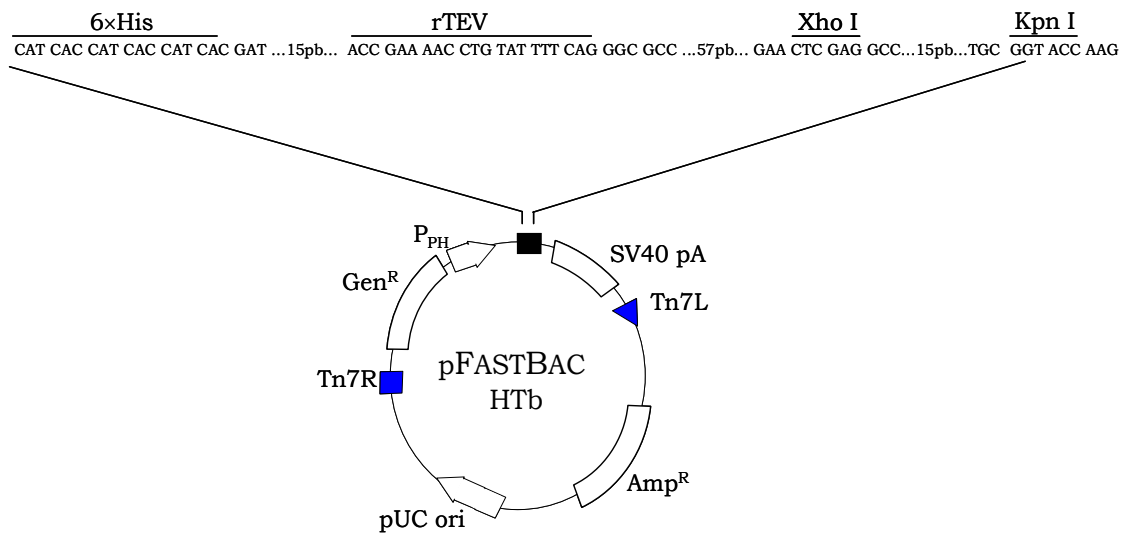


Figura II.4. Esquema del plásmido pFASTBAC HTb. Básicamente contiene un sitio de origen de replicación (pUC ori), un gen de resistencia a ampicilina, el transposón Tn7 con el gen de resistencia a gentamicina, una señal de poliadenilación (SV40 pA), un promotor fuerte de la transcripción (P_{PH}), un 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.

1.2.1.2. Transposición del ADN plásmídico 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 bácido 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 $lacZ\alpha$. 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 bácido parental (precisamente la región de unión de Tn7, incluida en el fragmento que codifica $lacZ\alpha$). 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 $lacZ\alpha$ del bácido parental.

Para obtener el bÁcrido recombinante, se lleva a cabo una transformaci3n 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 suspensi3n de células competentes bacterianas DH10BAC. Tras aÑadir el ADN, las células competentes se incubaron en hielo durante 30 min. A continuaci3n se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 seg, poniéndose de nuevo en hielo durante 2 min. Entonces se aÑadi3 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 disoluci3n, ajustando el pH a 7 con NaOH. Tras aÑadir el medio SOC, las células se incubaron en agitaci3n 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 (7 µg/ml) y tetraciclina (10 µg/ml), Bluo-gal (100 µg/ml) (Invitrogen, Life Technologies, CA, Estados Unidos) e IPTG (40 µg/ml) (Roche). Las placas se incubaron a 37°C durante 16-24 h.

Las colonias positivas, es decir, las que han incluido el bÁcrido recombinante, aparecieron de color blanco sobre un fondo de células de color azul, debido a la interrupci3n del gen LacZα.

1.2.1.3. Aislamiento del plÁsmido de ADN recombinante.

Se seleccionaron varias colonias de color blanco y se crecieron en agitaci3n en 2 ml de medio LB, con los antibióticos (kanamicina 50 µg/ml, gentamicina 7 µg/ml y tetraciclina 10 µg/ml), durante 16 h a 37°C. A continuaci3n, los cultivos se centrifugaron (5.000 rpm, 5 min), descartándose los sobrenadantes. Las células se lisaron y se purific3 el ADN plasmídico siguiendo el protocolo ya comentado anteriormente (Birnboim y Doly, 1979; Ish-Horowicz y Burke, 1981).

Finalmente, se comprob3 si contenía el fragmento de interés sometiendo a las muestras a una reacci3n de PCR, utilizando unos oligonucle3tidos específcos del ADN de PKCζ y analizando los productos obtenidos en un gel de agarosa para ADN.

1.2.1.4. 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). Para ello, se preparó una placa de cultivo de 3,5 cm de diámetro con unos 2×10^6 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 (penicilina 100U/ml, estreptomina 0,1mg/ml, anfotericina B 0,25 μ g/ml) (Sigma). A continuación se prepararon dos disoluciones:

Disolución A: 149 μ l de tampón Hepes 50 mM pH 7,05 y 3 μ l de Na_2HPO_4 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 a temperatura ambiente 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.5](#). muestra el esquema básico de la obtención del baculovirus recombinante.

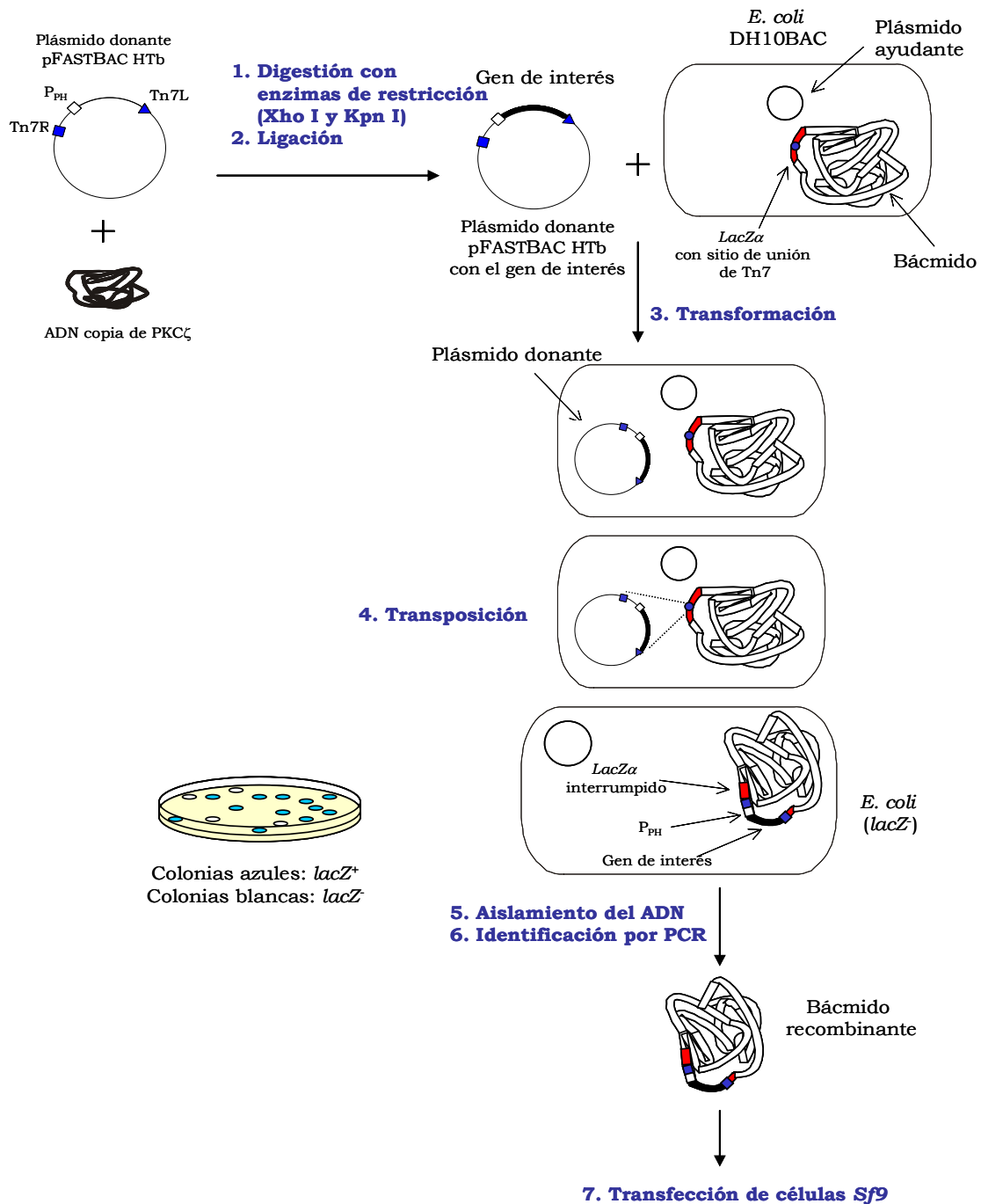


Figura II.5. Esquema básico de la obtención de un baculovirus recombinante.

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 *LacZa*, 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.

1.2.2. Cultivo de células de insecto Sf9.

Las células de insecto Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Co., CA, Estados Unidos) se crecieron a 27°C en frascos de 25 cm² (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 0,25µg/ml).

1.2.3. Purificación del dominio catalítico de la PKCζ.

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 elevado del baculovirus recombinante (aproximadamente 5 pfu/célula) y se mantuvo a 27°C durante unas 60 h (hasta alcanzar una viabilidad celular de, aproximadamente, el 70%).

Pasado este tiempo, las células se recogieron y se centrifugaron a 7.000 rpm durante 15 min, desechándose el sobrenadante. El precipitado celular se sometió al proceso de purificación, que consistía en los siguientes pasos:

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 8,0), KCl 400 mM, Tritón X-100 0,25 %, NaF 50 mM, glicerol al 10 % (v/v), benzamidina 10 mM, PMSF 1mM, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 4 µg/ml, inhibidor de tripsina 10 µg/ml y aprotinina 4 µg/ml (todos estos reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, Estados Unidos). Las células se lisaron mediante ultrasonidos (6 ciclos \times 10 seg) y el homogeneizado resultante se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min a 4°C.

b) *Incubación con resina de níquel.* La mezcla de lisados celulares se aplicaron en suspensión a 2 ml de resina Ni-NINTA® (QIAGEN, Hilden, Alemania), la cual había sido equilibrada previamente con tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 200 mM y DTT 0,5 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 150, 300 y 500 mM, respectivamente) y se recogieron fracciones de aproximadamente 0,5 ml. Mediante un gel de electroforesis desnaturante (SDS-PAGE, 12,5 % gel separador) y a partir de alícuotas de las fracciones obtenidas en el proceso de elución, se pudo determinar que la mayor parte del dominio catalítico eluía a una concentración de 150 mM de imidazol.

d) *Dilución de Imidazol.* Las fracciones donde aparecía el dominio catalítico de la PKC ζ se mezclaron y el imidazol presente se diluyó hasta valores inferiores a 20 mM utilizando unas unidades de filtración en centrífuga Ultrafree-30 (Millipore Corp. Bedford, MA, Estados Unidos).

e) *Columna MonoQ 5/50 GL®* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). La mezcla se cargó en esta columna de intercambio iónico capaz de separar las proteínas en base a su carga. Para ello, la columna previamente se equilibró con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 200 mM, glicerol al 10% (v/v) y DTT 0,5 mM, a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La proteína se eluyó en el mismo tampón con un gradiente creciente de sal (NaCl 0,2-1 M), recogiendo fracciones de 1 ml. Para ello se utilizó el dispositivo AKTA-FPLC (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) donde se obtuvieron dos picos bien diferenciados. La presencia de la proteína se detectó en ambos picos mediante tinción de plata de un gel de electroforesis desnaturante (SDS-PAGE, 12,5% gel separador).

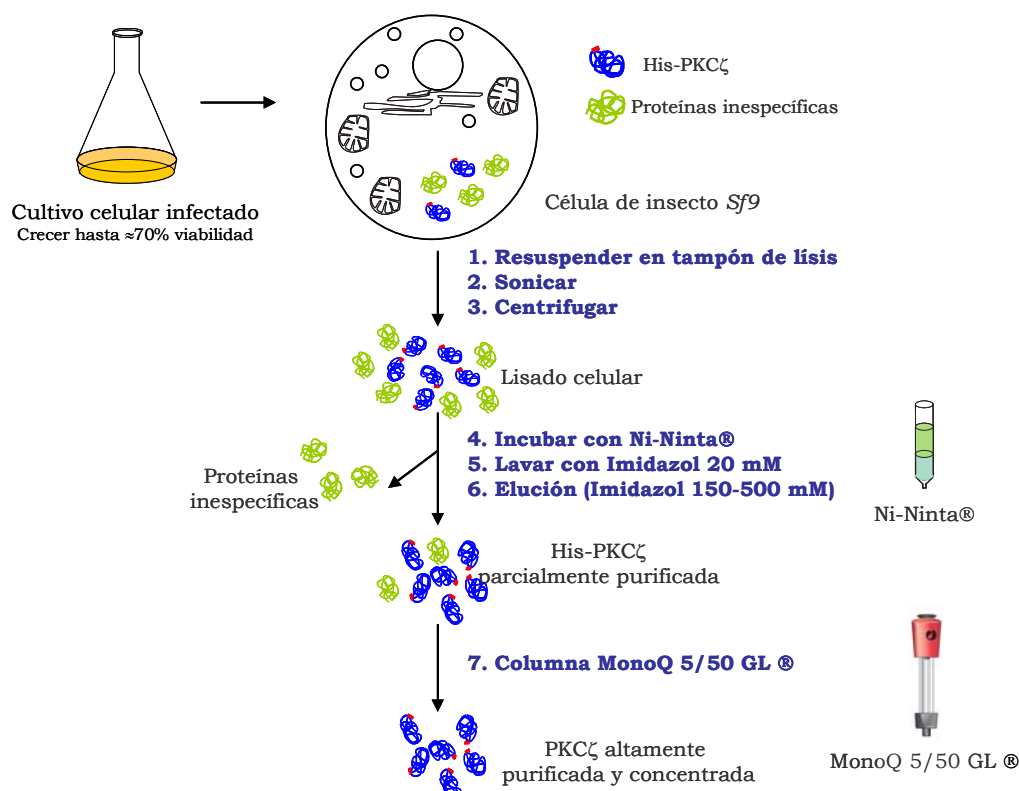


Figura II.6. Esquema de la purificación del dominio catalítico de la PKC ζ en células de insecto *Sf9*. Tras incubar un cultivo de células *Sf9* infectado con el baculovirus recombinante durante unas 60 h, las células se recogieron y lisaron. Después de eliminar el material insoluble por centrifugación, el lisado celular se incubó con la resina Ni-NINTA®, 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 150-500 mM. La suspensión se pasó a través de una columna MonoQ 5/50 GL® con un gradiente creciente de sal (0,2 - 1 M NaCl).

f) *Columna Superdex 200 10/300 GL®* (GE Healthcare Bio-Sciences-AB, Uppsala, Suecia). Esta columna de filtración en gel se utilizó con el propósito de comprobar la naturaleza de estos dos picos observando que se debían a dos poblaciones distintas de la misma proteína: monomérica y agregada. En este caso, la proteína se eluyó en un tampón compuesto por: Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 0,5 M, glicerol 5% (v/v) y DTT 0,5 mM y se recogieron fracciones de 1 ml. Para ello, de nuevo se utilizó el equipo de purificación AKTA-FPLC (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia). 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 PKC ζ en su forma monomérica era altamente pura, como se verificó en un gel de electroforesis desnaturante (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 5 % (v/v), Tris 20 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM y DTT 0,5 mM (Sigma). La [Figura II.6.](#) muestra el esquema general de la purificación de la PKC ζ a partir de células de insecto Sf9.

1.3. OBTENCIÓN DE LOS DOMINIOS C1B DE LAS ISOENZIMAS PKC α , PKC γ , PKC δ Y PKC ϵ .

1.3.1. Construcción de los plásmidos de expresión.

Los ADN copia de las diferentes isoenzimas utilizadas se obtuvieron gracias a los Dres. Nishizuka y Ono (Universidad de Kobe, Kobe, Japón) excepto para el caso de la PKC γ cuyo ADN copia se obtuvo del laboratorio del Dr. Tobías Meyer (Universidad de Stanford, Stanford, CA, Estados Unidos).

Para el proceso de construcción de los diferentes plásmidos de expresión se llevaron a cabo los diferentes pasos de clonación.

1.3.1.1. Amplificación mediante PCR y digestión de los fragmentos de ADN correspondientes a cada uno de los dominios C1.

Los diferentes fragmentos de ADN se amplificaron mediante la técnica de PCR utilizando para cada dominio los oligonucleótidos específicos de secuencia ([Tabla II.1](#)) Además de destacar la región amplificada en cada dominio C1 también se especifica qué extremo es el que se amplifica con cada uno de los oligonucleótidos utilizados.

Los fragmentos obtenidos de las isoenzimas α y δ , se digirieron mediante las enzimas de restricción HindIII y BamHI mientras que para las isoenzimas γ y ϵ las enzimas de restricción utilizadas fueron HindIII y XmaI (todas las enzimas se obtuvieron de Roche Diagnostics GmbH, Alemania).

Tabla II.1. Oligonucleótidos específicos utilizados para la amplificación mediante PCR de los distintos dominios C1. Se muestran las distintas regiones de los dominios C1 amplificadas así como los diferentes oligonucleótidos utilizados para amplificar los extremos 3' y 5' de cada uno de los ADN copia.

Región amplificada (aa)		oligonucleótidos	
C1Bα	R99-D154	extremo 3' extremo 5'	5'-CGGGATCCTCAATCCATTCCGCAGAG-3' 5'-CCGAAGCTTAGAAGCAAGCACAAG-3'
C1Bγ	R98-V153	extremo 3' extremo 5'	5'-GGATCCCGGGTCAGTCCACGCCGC-3' 5'-CCGAAGCTTCGCAACAAGCACAAG-3'
C1Bδ	D228-N283	extremo 3' extremo 5'	5'-AAGGATCCTCAGTTGATACCACACAG-3' 5'-TATAAGCTTGACATGCCTCACCGA-3'
C1Bϵ	N240-D295	extremo 3' extremo 5'	5'-AAATCCCGGGTCAGTCCACCCCACAATTG-3' 5'-CCGAAGCTTAACATGCCCCACAAG-3'
C1ζ	A128-H183	extremo 3' extremo 5'	5'-AAGGATCCTGCAATGCCTCCTGCAGGT3-3' 5'-TATAAGCTTGCCAACGGCCACCTC-3'

1.3.1.2. Corte del vector de expresión.

La clonación se llevó a cabo en el vector pECFP modificado tal y como se describe en Marín-Vicente y col., (2005). Básicamente, esta modificación consistió en la delección del gen que codificaba para la proteína amarilla fluorescente (EYFP) y se introdujo el gen que codifica para la proteína cian fluorescente (ECFP) entre los sitios de corte de las enzimas de restricción BglII y HindIII (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) del sitio de clonación múltiple. El vector pECFP incluye, además de la secuencia que codifica la CFP, un promotor de la transcripción del citomegalovirus (P_{CMV}), dos orígenes de replicación (f1 y SV40) y un gen de resistencia a kanamicina.

La clonación en este vector implica la expresión de cada uno de los dominios C1 fusionados al extremo C-terminal de la proteína cian fluorescente o ECFP lo que nos permite su detección, en los ensayos de Espectroscopía de Fluorescencia realizados en la presente Memoria, por su emisión a 473 nm.

Este plásmido se cortó con las mismas enzimas de restricción utilizadas para los fragmentos clonados con HindIII y BamHI (C1B α y C1B δ) ó HindIII y XmaI (C1B γ y C1B ϵ). Posteriormente, dichos plásmidos se sometieron a tratamiento con fosfatasa para eliminar

los grupos fosfato de los extremos 5' que favorecen la religación del plásmido sin el inserto de interés.

Los procesos de ligación y selección de los plásmidos son similares a los ya explicados en los apartados 1.1.1.3. y 1.1.1.4. del presente Capítulo.

1.3.2. Expresión de los diferentes dominios C1 en células de mamífero HEK293.

Cada uno de los dominios C1 clonados en el vector ECFP se expresaron en el sistema de células de mamífero HEK 293 (células epiteliales de riñón humano).

1.3.2.1. Cultivo en células de mamífero.

Las células HEK 293 (células epiteliales de riñón humano), se cultivaron en placas de cultivo de 9 cm de diámetro a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 10% de CO₂.

El medio de cultivo utilizado fue DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con 0,3 mg/ml de L-glutamina y un 10% (v/v) de suero bovino fetal, y con concentraciones de penicilina y estreptomycin correspondientes respectivamente a 50 U/ml y 50 µg/ml.

Para la expresión de cada uno de los clones, se cultivaron simultáneamente 2 frascos de 75 cm² de cada uno de ellos y se transfectaron con el correspondiente ADN plasmídico, una vez que se había alcanzado una confluencia aproximada del 80% (8 x 10⁶ células/placa). Pasadas las 36-40 horas de transfección, las células eran lisadas para la realización de las medidas de fluorescencia.

1.3.2.2. Transfección de las células por precipitación de fosfato cálcico.

La transfección de las células de mamífero HEK 293 se realizó mediante el método de precipitación de fosfato cálcico (Wigler y col., 1977).

Básicamente, la transfección de cada placa de células por este método, requirió la preparación de dos reactivos diferentes (A y B).

El reactivo A incluía 0,54 ml de tampón Hepes 50 mM pH 7,05 y 11 μ l de Na_2HPO_4 1,5 mM. Por su parte, el reactivo B, se preparó añadiendo 10 μ g del ADN plasmídico correspondiente a 0,48 ml de tampón TE (Tris-HCl 1 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM) y una vez mezclados ambos compuestos, se añadieron a la mezcla 66 μ l de CaCl_2 2 M.

Trascurridos 5 minutos desde la preparación de ambos reactivos, se mezclaron, formándose un precipitado correspondiente al fosfato cálcico. La mezcla constituida por ambas disoluciones se incubó a temperatura ambiente durante los 20 minutos previos a su adición a la placa de células.

Una vez incluida la mezcla de transfección, la placa, se mantuvo durante 14 horas en incubación a 37°C y en una atmósfera del 5% de CO_2 .

Transcurrido el tiempo de incubación con la disolución de transfección, las células se lavaron con PBS (tampón fosfato salino) y se incubaron en medio de cultivo DMEM suplementado tal y como se indica en el apartado 1.4.2.1. del presente Capítulo.

1.3.2.3. Obtención del lisado celular que contiene los diferentes dominios C1.

Las células HEK 293 se lisaron a las 24 horas después de eliminar la solución de transfección. Para ello, se lavaron dos veces con PBS, se recogieron y se centrifugaron. Las células se resuspendieron, a una concentración de 10×10^6 células/ml, en un tampón de lisis que contenía: Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) e inhibidores de proteasas como aprotinina 10 μ g/ml, leupeptina 10 μ g/ml, PMSF 1 mM, NaF 10 mM y Na_3VO_4 5 mM y se incubaron durante 20 min a 4°C. El lisado se pasó 12-15 veces a través de una jeringuilla de insulina para conseguir homogeneización. Posteriormente se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante resultante fue el que se utilizó directamente para realizar los ensayos de fluorescencia.

1.4. 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.

1.5. 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 las $\text{PKC}\alpha$ y $\text{PKC}\epsilon$ 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 el dominio catalítico de la $\text{PKC}\zeta$ 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.

1.6. TINCIÓN DE LOS GELES DE ELECTROFORESIS.

1.6.1. 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 tiñeron con una disolución que contenía AgNO₃ al 0,1% (p/v), NH₄NO₃ al 0,1% (p/v), ácido wolfrámico-silícico al 0,5% (p/v), formaldehído al 0,14% (v/v) y Na₂CO₃ 2,5% (p/v).

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

1.6.2. Tinción con azul 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).

1.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS.

1.7.1. Determinación de la concentración de fosfolípido.

Para determinar la concentración de fosfolípido se utilizó el método descrito por Böttcher 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, a excepción del fosfoinosítido PtdIns(4,5)P₂ que presenta una estequiometría 1:3.

La recta patrón de Pi se confeccionó a partir de una disolución estándar de Na₂HPO₄ 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 HClO₄ al 60% (v/v) y todos se incubaron a 180-190°C durante 30 min en un termobloque. Posteriormente se añadió a cada tubo 4 ml de reactivo de molibdato, el cual contenía 2,2 g de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, (Merck) y 14,3 ml de H₂SO₄ 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.

1.7.2. 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 N₂. A continuación, se añadieron 2 ml de H₂SO₄ 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 termobloque. Seguidamente, se añadieron 5 ml de agua y 3 ml de hexano. Los tubos se agitaron fuertemente y después se centrifugaron en una centrífuga 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.

1.8. PREPARACIÓN DE VESÍCULAS FOSFOLIPÍDICAS.

Todos los lípidos (fosfolípidos y diacilgliceroles) se conservaron disueltos en cloroformo o cloroformo/metanol 2:1 (v/v) a -80°C .

1.8.1. Vesículas multilamelares (MLV).

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.

1.8.2. 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 14.000 rpm durante 30 min para separar las posibles MLV que quedasen y eliminar las partículas de titanio desprendidas del sonicador.

2. TÉCNICAS GENERALES.

2.1. 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 calorímetro utilizado fue el calorímetro VP-ITC (Valery Plotnikov Isothermal Titration Calorimeter, Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.), que básicamente consta de una jeringa de precisión, una celda de muestra donde se añade la macromolécula y una celda de referencia que contiene el mismo tampón en el que van disueltos tanto el ligando como la macromolécula. El ligando L se inyecta con la jeringa 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 la celda de referencia. 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.7.](#) 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, $\Delta q_{i,ap}$, entre las inyecciones $i-1$ e i , y se corresponde con el área bajo el pico i ,

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

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.

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.7). 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.7. 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 $1/K_a$.

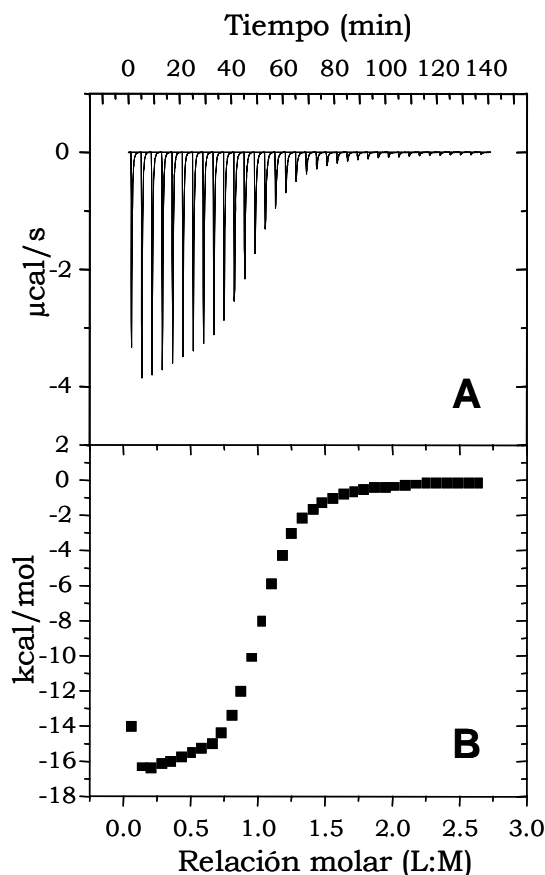


Figura II.7. Datos obtenidos de un experimento de calorimetría de titulación isotérmica (ITC). Se muestran los datos crudos de la unión de ARN a la proteína ARNasa A, los cuales representan los calores liberados o absorbidos en cada inyección (A) y estos mismos datos una vez integrados en función de 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.).

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 se puede calcular 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 .

2.2. 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 se puede obtener lo que comúnmente se denomina *termograma* (Figura II.8). En éste se pueden destacar cinco parámetros importantes que proporcionan información sobre las propiedades termotrópicas del 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.

Otras características que presenta la calorimetría diferencial de barrido es que carecen de agitación mecánica evitando así, el aporte calorífico por *efecto Joule* que podría llegar a ser incluso mayor que el efecto calorífico medido si el líquido tuviese, por ejemplo, una elevada viscosidad. Además estos calorímetros que se utilizan actualmente funcionan de modo adiabático, es decir, que no intercambian calor con su entorno. Y por último, el que el conjunto de células sea fijo (no desmontable) permite una mayor reproducibilidad en los datos.

El calorímetro utilizado en esta Memoria es el calorímetro VP-DSC (Valery Plotnikov Differential Scanning Calorimeter, Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) caracterizado por presentar una gran sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la línea base debido a la gran mejora en la adiabaticidad del sistema. Básicamente, consta de dos células gemelas, una actúa de referencia (que se llena con la misma disolución tampón en la que se encuentra la biomolécula) y la otra contiene la muestra (en nuestro caso, la disolución de proteína en el tampón de referencia), ambas se encuentran simétricamente alineadas dentro de un caparazón metálico diseñado para crear un entorno casi adiabático. La temperatura de este caparazón se controla mediante termosensores y efectores apropiados para que esté en todo momento muy próxima a la temperatura de las células. Por último, una termopila de elevada sensibilidad es la encargada de medir la diferencia de temperatura entre las células calorimétricas.

2.2.1. Calorimetría diferencial de barrido en 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.8](#). (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 hidrocarburadas, 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 hidrocarbúridas (Luzzati, 1968).

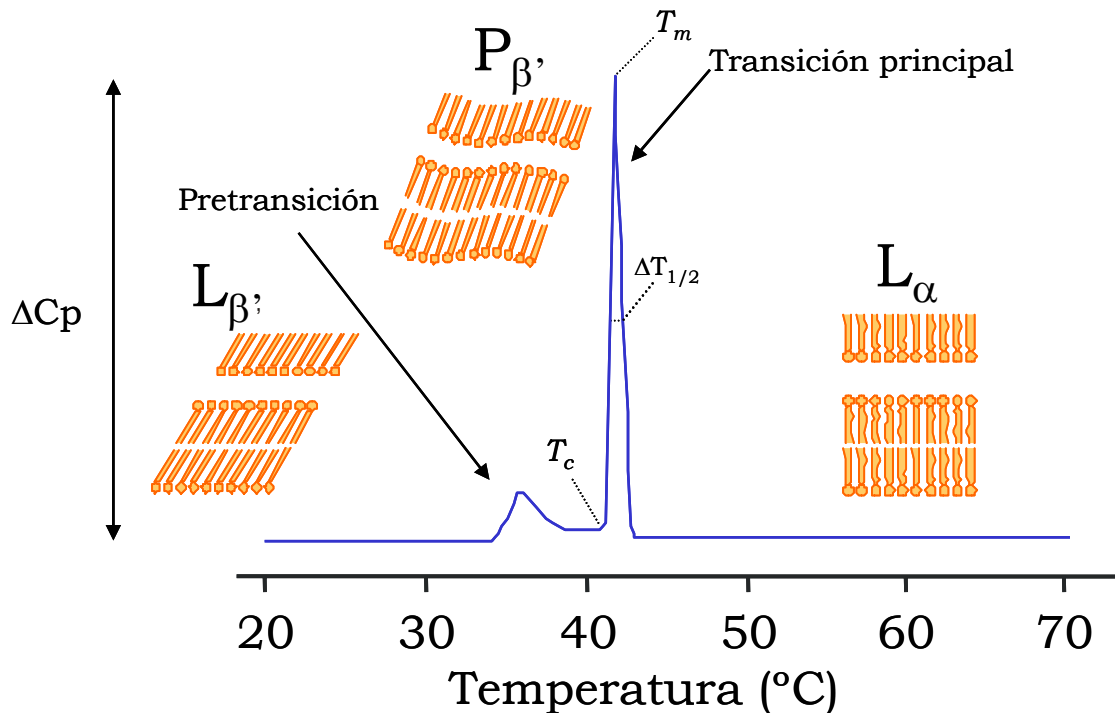


Figura II.8. Termogramas de DSC de 1,2-dipalmitil-*sn*-glicerol-3-fosfolina, DPPC. Se muestran los principales parámetros que se pueden obtener a partir de los termogramas: el incremento de la entalpía de transición (ΔH), la temperatura de transición (T_c), la temperatura de transición media (T_m), la 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 las distintas fases en que podemos encontrar a estos fosfolípidos. 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*.

2.3. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Es una técnica que gracias a su alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad se ha convertido en indispensable para el estudio de numerosos procesos biológicos en solución, tales como las propiedades dinámicas de proteínas, unión de moléculas a membranas o formación de complejos, entre otros.

La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres estados que ocurre en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterociclos) llamadas fluoróforos.

Estado 1: Excitación.

Un fotón de energía $h\nu_{EX}$ procedente de una fuente externa de energía es absorbido por el fluoróforo creando un singlete electrónico en estado excitado (S_1'). Este proceso distingue fluorescencia de quimioluminiscencia, en el cual el estado excitado se produce por una reacción química (Figura II.9).

Estado 2: Ciclo de vida del estado excitado.

El estado excitado existe durante un tiempo determinado (generalmente 1-10 nanosegundos). Durante este tiempo el fluoróforo sufre cambios conformacionales y está sujeto a la posibilidad de establecer multitud de interacciones con su entorno molecular. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes. La primera es que la energía de S_1' se disipa parcialmente pasando el singlete a un estado electrónico excitado pero relajado (S_1) desde el cual se origina la emisión de fluorescencia. La segunda es que hay moléculas excitadas por absorción (estado 1) que no vuelven al estado fundamental (S_0) por emisión de fluorescencia (Figura II.9).

Estado 3: Emisión de fluorescencia.

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 S_0 . En este proceso, el electrón emite energía ($h\nu_{EM}$) en forma de radiación electromagnética en el proceso que se conoce como fluorescencia (Lakowicz, 1983). A causa de la energía disipada durante el ciclo de vida del estado excitado la energía de este fotón es menos que la del fotón de excitación $h\nu_{EX}$. La diferencia de energía entre ambos fotones es el desplazamiento de Stoke (será tratado posteriormente).

Una forma de representar este proceso es a través de los diagramas de Jablonski, como se puede observar en la Figura II.9.

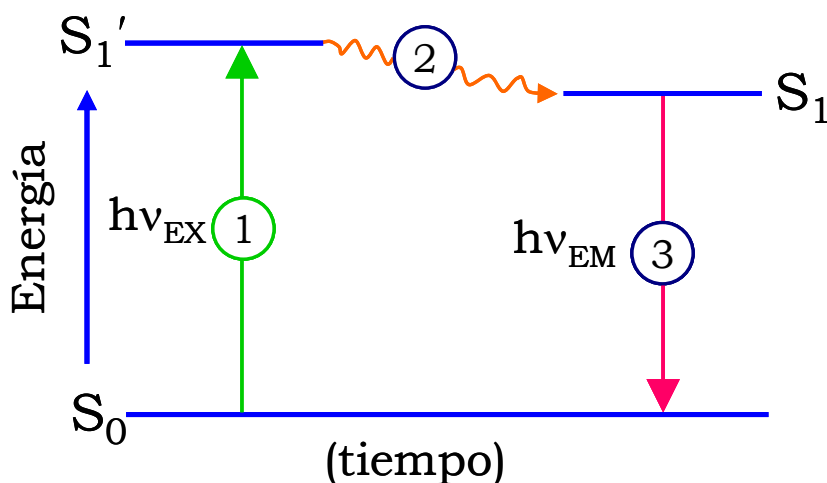


Figura II.9. Diagrama de Jablonski. Procesos implicados en la creación de un estado electrónico excitado por absorción óptica y la subsecuente emisión de energía. 1: hace referencia a la excitación, 2: al curso de vida del estado excitado y 3: a la emisión de energía.

Hay ciertos parámetros que nos van a permitir estudiar el fenómeno de fluorescencia de forma cuantitativa, no sólo de la molécula fluorescente sino también de su entorno; por lo que se entiende la importancia que ha tomado esta técnica. Los parámetros fundamentales son:

-El *tiempo de vida media* es el periodo medio de tiempo en el que la molécula fluorescente permanece en el estado excitado.

-La *anisotropía* es el efecto observado cuando la radiación electromagnética es luz polarizada.

-El *rendimiento cuántico* o cociente entre el número de fotones emitidos por fluorescencia y el número de fotones absorbidos por la molécula.

-El *espectro de emisión*. En fluorescencia se le concede mayor importancia al fenómeno de emisión, cuyo estudio resulta más eficaz que el de absorción, ya que el espectro de emisión varía notablemente dependiendo del entorno de la molécula fluorescente. Se representa como intensidad frente a longitud de onda, λ , o número de onda, ν . Las radiaciones fluorescentes emitidas por los compuestos orgánicos suelen estar comprendidas en el intervalo de 300-600 nm. La emisión de fluorescencia tiene características propias. El espectro de emisión

se encuentra a longitudes de onda mayores y representa menor energía que el espectro de absorción. A esta diferencia es a la que se denomina desplazamiento de Stoke, referente a la pérdida parcial de energía de forma no radiante, cuando el electrón excitado vuelve al estado fundamental. Normalmente, ambos espectros (el de absorción y el de emisión) son simétricos ya que las transiciones de los electrones son iguales en ambos casos, así que cuanto más asimétricos sean, mayores serán también las diferencias entre las transiciones de energía. Cabe destacar otra característica de los espectros de emisión y es que son independientes de la longitud de onda de excitación. Sin embargo, la intensidad de emisión es proporcional a la amplitud del espectro de excitación a una longitud de onda determinada (Figura II.10).

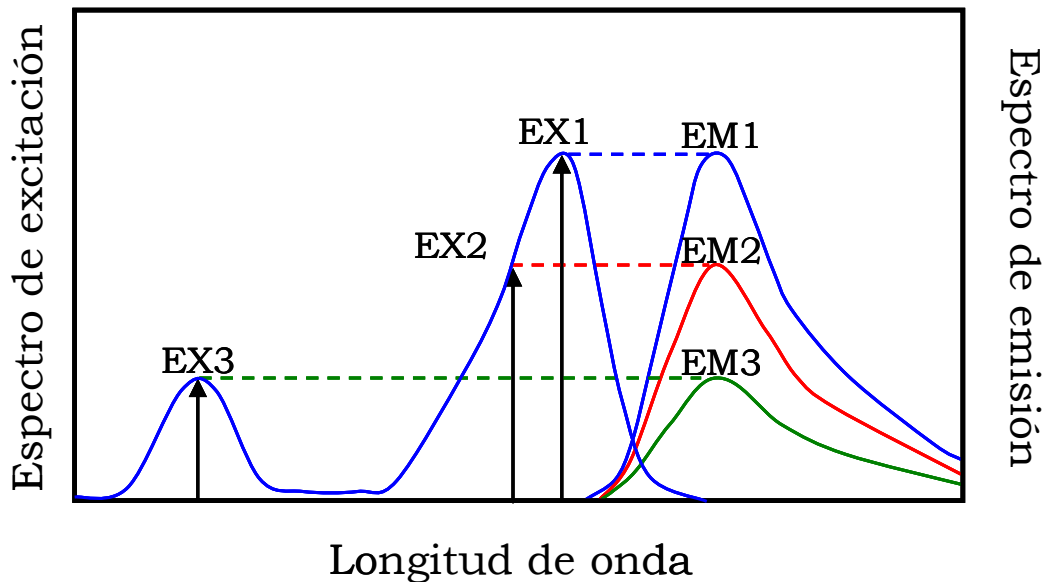


Figura II.10. Comportamiento de un fluoróforo sometido a diferentes longitudes de onda de excitación (EX 1, EX 2, EX 3). Se muestran los perfiles de excitación y emisión de un fluoróforo que es excitado a diferentes longitudes de onda. Como se puede observar, no varía el perfil de emisión, pero produce variaciones en la intensidad de emisión de fluorescencia (EM 1, EM 2, EM 3), que corresponde a la amplitud del espectro de excitación.

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 y rhodamina (muy empleadas en el estudio de inmunoglobulinas), compuestos derivados del dansilo como el dHPE o el Oregon Green® 488 DHPE (para el estudio de membranas), derivados del ATP 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.

2.3.1. 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 se excita máximamente en la longitud de onda de absorción de 280 nm. 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 Van Mau, 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:

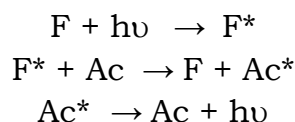
$$\Delta F_{rel} = \frac{F_i - F_{min}}{F_{max} - F_{min}}$$

Donde F_i 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.

2.3.2. 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 excitado donante (F^*) a un aceptor (Ac) que se encuentra en el estado

fundamental. Este último será excitado y en su regreso al estado fundamental emitirá también fluorescencia. En resumen:



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 y sólo en el caso de que haya transferencia de energía, al excitar al fluoróforo donante se recoge la emisión de fluorescencia del fluoróforo aceptor. 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, E , depende de diversos factores, entre ellos: el 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.

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:

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

R_0 es un parámetro conocido como la *distancia crítica de Förster* donde la transferencia de energía entre el par dador-aceptor es del 50 %.

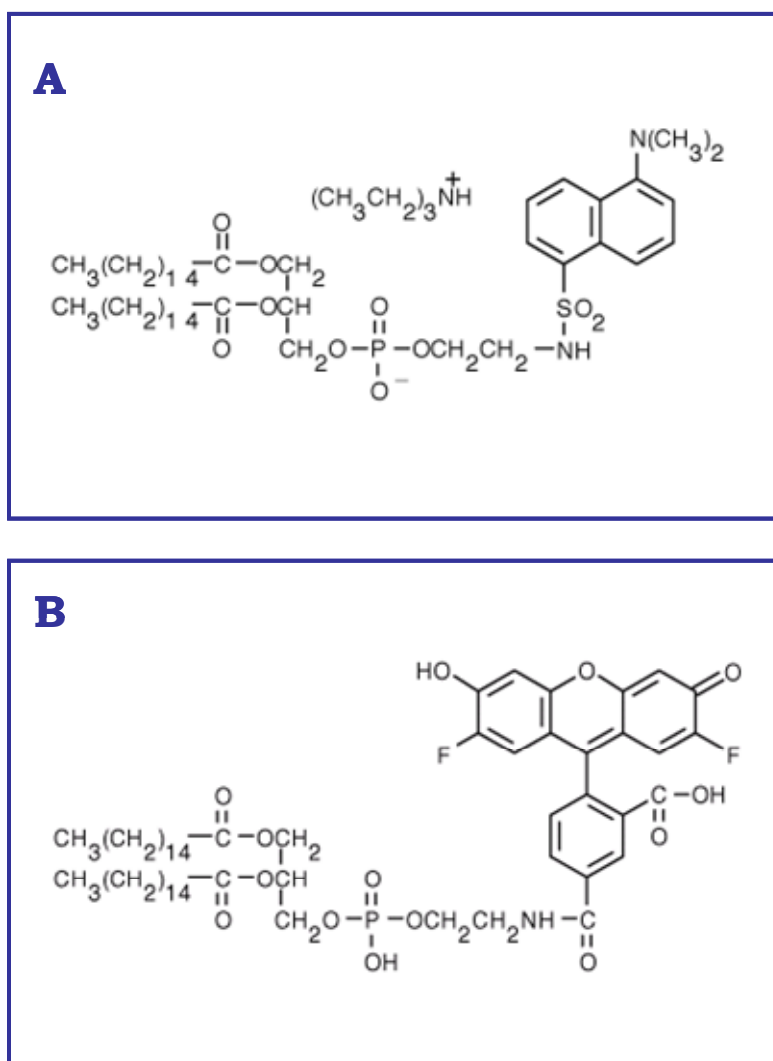


Figura II.11. Estructuras moleculares de la sal de trietilamonio de *N*-(5-dimetilamino-naftalén-1-sulfonil)-1,2-dihexadecanil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (dansil-DHPE o d-PE) (A) y de Oregon Green® 488 1,2-dihexadecanil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (Oregon Green-DHPE) (B).

Dada la dependencia de la distancia existente entre los fluoróforos para la transferencia de energía (0-100 Å), 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. En la [Figura II.11](#), se muestran las estructuras de los derivados de dansilo utilizados en los ensayos experimentales en este trabajo.

Así, la transferencia de energía sólo será posible cuando ambos fluoróforos se encuentren lo suficientemente cerca (0-100 Å) y por tanto haya tenido lugar la interacción, en nuestro caso, interacción lípido-proteína.

En esta Memoria se ha estudiado la interacción entre el dominio C2 de la PKC α y los diferentes mutantes a lípidos incorporados en membranas modelo y la interacción de los dominios C1 de las isoformas α , γ , δ y ϵ también a diferentes membranas modelo.

En cada uno de los casos, aunque el objetivo que se perseguía era similar, el modelo experimental fue distinto. De manera, que para el caso del dominio C2 se consideraron los residuos de Trp como fluoróforo intrínseco donante de energía y la molécula aceptora que se utilizó fue el dansil-DHPE (Invitrogen Co., CA, USA) ([Figuras II.11A y II.12A](#)). Para el caso de los dominios C1, al carecer de residuos de Trp susceptibles de excitación, se fusionó a una proteína fluorescente que sirvió como molécula donadora extrínseca de energía, la proteína cian fluorescente o CFP, y paralelamente se utilizó la molécula aceptora correspondiente que aunque también fue un derivado del dansilo se trató del Oregon Green® 488 DHPE (Invitrogen Co., CA, USA) ([Figuras II.11B y II.12B](#)).

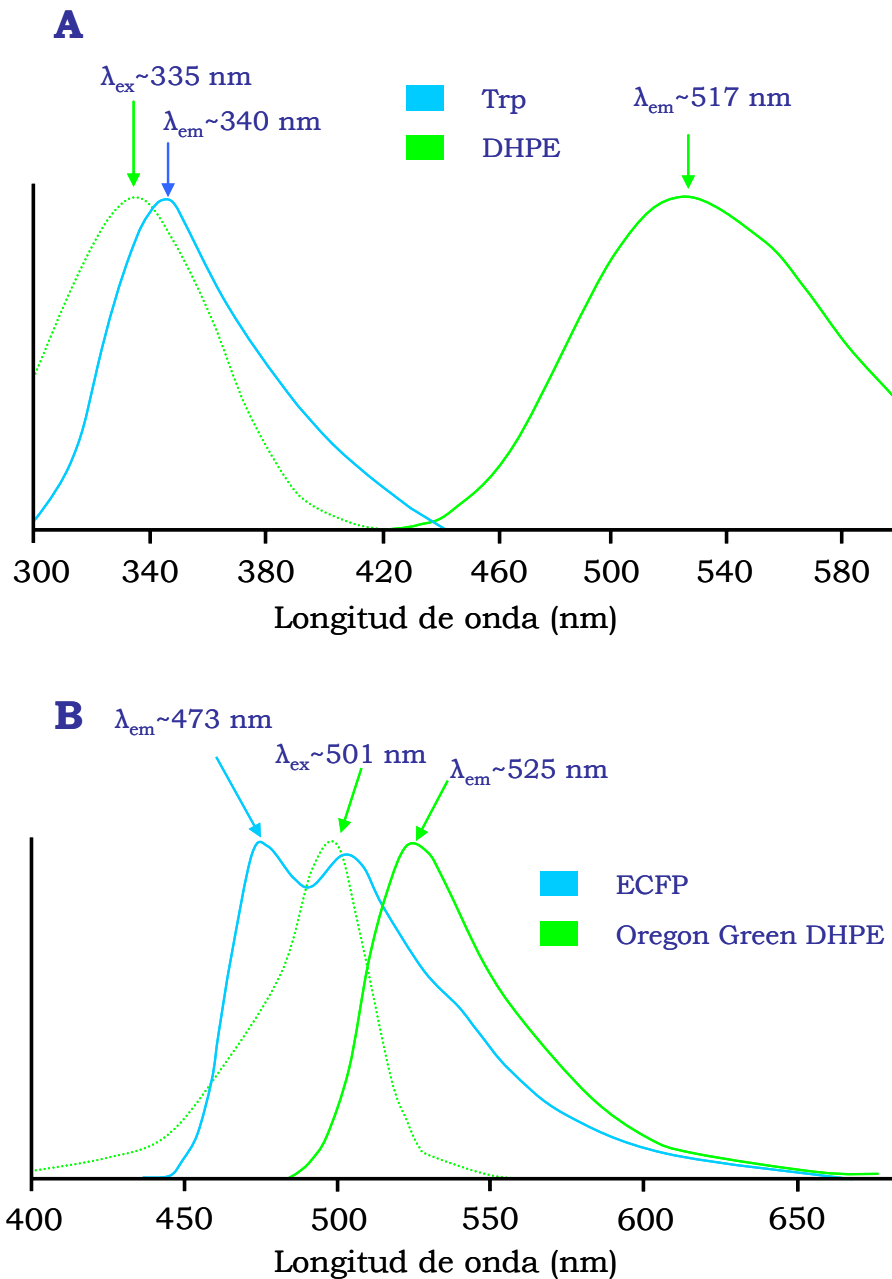


Figura II.12. Solapamiento de los espectros de emisión y excitación utilizados en transferencia de energía (FRET) del dominio C2 de la PKC α (A) y de los dominios C1 de las diferentes isoenzimas de la PKC (B). En las figuras A y B se muestran los espectros de emisión de los fluoróforos dadores de energía, Trp o ECFP, respectivamente y la longitud de onda donde presentan su máxima emisión. A su vez, también aparecen los fluoróforos aceptores, DHPE u Oregon Green® DHPE, que en caso de que haya transferencia de energía presentarán un λ_{em} máximo de 340 y 525 nm respectivamente.

2.4. 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 solo se puede aplicar 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 (μ) adquiere una orientación paralela o antiparalela (θ o $180-\theta$) respecto a dicho campo para alcanzar el estado de mínima energía (Figura II.13). 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) o *frecuencia de Larmor* (o de *precesión*) 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.

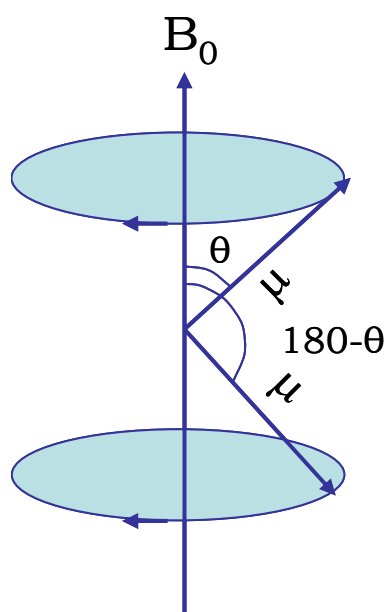


Figura II.13. Orientaciones del momento magnético (μ) en dos estados spin, inducida por el campo magnético externo B_0 .

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. La vuelta al equilibrio ocurre mediante dos mecanismos distintos regulados por los tiempos de relajación T_1 y T_2 .

Durante el tiempo de relajación longitudinal (T_1) los núcleos excitados devuelven la energía adquirida al medio circundante con una velocidad regulada por una constante de tiempo T_1 . El tiempo de relajación T_1 gobierna el retorno a las poblaciones de equilibrio y depende del entorno molecular que rodea al núcleo estudiado, es decir, de la fuerza con la que el núcleo está “anclado” a la red de núcleos vecinos, del tipo de núcleo y del estado físico de la muestra (sólida o líquida).

Por otro lado, el tiempo de relajación transversal (T_2) describe la interacción entre los núcleos vecinos con frecuencias precesionales idénticas pero que difieren en el estado magnético cuántico. En esta situación, el núcleo puede intercambiar estados cuánticos, es decir, un núcleo en estado basal pasa a un estado excitado, mientras que el núcleo excitado pasa a un estado de reposo. No hay cambio neto del estado de energía entre las poblaciones pero el tiempo de vida media del núcleo en estado excitado descenderá.

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 .

2.4.1. Rotación a alta velocidad en el ángulo mágico (MAS).

Una técnica de RMN, que suministra espectros informativos de alta resolución, tanto con membranas naturales como con vesículas multilamelares es la *rotación a alta velocidad en el ángulo mágico (MAS)* (Chapman y col., 1972). Esta técnica supone una alternativa para obtener información directa de la estructura y dinámica de membranas, al mismo tiempo que hace posible determinar las propiedades de las moléculas incorporadas en ellas (Olfield y col., 1987). Cuando se estudian sustancias en disolución, la libertad de movimiento de las moléculas da un promediado de las distintas posiciones de los núcleos, obteniéndose espectros con picos bien definidos sobre los que se puede trabajar fácilmente. Sin embargo, en muestras sólidas o cuasi-sólidas aparecen dos problemas, la

interacción dipolo-dipolo y la interacción de desplazamiento químico. Ambas producen un acusado ensanchamiento de las señales del espectro, haciendo extremadamente difícil la visualización y asignación de las resonancias.

La *interacción dipolar* tiene lugar entre los espines que interaccionan a una distancia r que depende de la estructura. Este ensanchamiento depende del término $(1-3\cos^2\theta)$ donde θ es el ángulo entre el vector internuclear y el campo magnético aplicado. Como resultante se obtienen espectros muy anchos. Para los núcleos con espín $\frac{1}{2}$ (p.e. ^{31}P) éste es el factor dominante en el ensanchamiento observado en los espectros de sólidos que puede llegar a 80 kHz para interacciones protón-protón e independiente del campo magnético aplicado. En general, la energía de estas interacciones se expresa:

$$E = \frac{\mu_i \mu_s (1-3\cos^2 \theta)}{r^3}$$

La *interacción de desplazamiento químico* aparece por la modificación local del campo magnético aplicado que experimenta un núcleo dado debido a que está en un entorno de electrones determinado. La media de las interacciones en todas las posibles orientaciones en una muestra policristalina origina un ensanchamiento que depende del campo aplicado. Al igual que las interacciones dipolares, la anisotropía de desplazamiento químico depende también del factor $1-3\cos^2 \theta$.

La rotación en el ángulo mágico y el desacoplamiento durante la adquisición se utilizan para reducir al máximo el ensanchamiento o desdoblamiento de señales debido a efectos de interacción de desplazamiento químico y de acoplamiento dipolar anteriormente comentados. Ambos tipos de interacciones tienen una dependencia angular de θ . Si hacemos que el ángulo θ sea de $54^\circ 44'$, el factor $1-3\cos^2 \theta$ se hace cero con lo que anulamos los efectos de ensanchamiento producidos por estas interacciones. Esto se consigue colocando la muestra en rotores especiales que se disponen con una inclinación de $54^\circ 44'$ respecto al campo magnético B_0 . El resultado son espectros de alta resolución con resonancias estrechas y bien diferenciadas. A este ángulo $\theta = 54^\circ 44'$ se le conoce como *ángulo mágico* (Sanders y Hunter, 1988).

2.5. ESPECTROSCOPIA 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.14).

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”.

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).

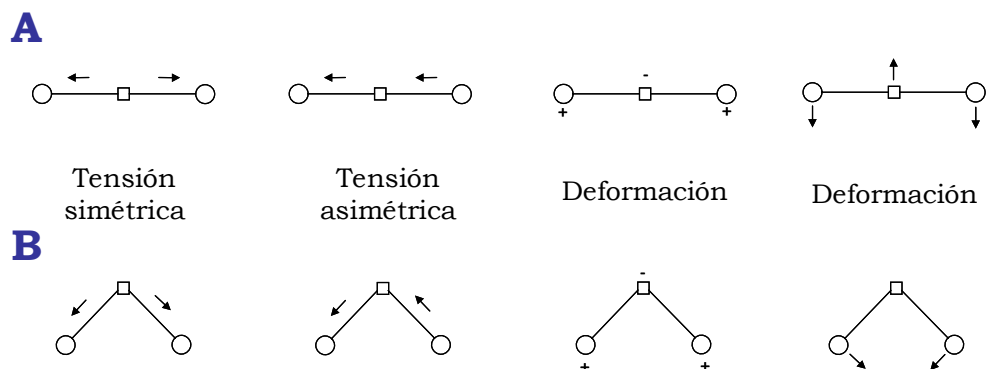


Figura II.14. Esquema con los tipos de vibraciones normales en una molécula triatómica lineal (A) y no lineal (B). Los desplazamientos atómicos están representados por flechas (en el plano) y por los símbolos - y + (fuera del plano). Tomado de Arrondo y col., (1993).

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.

2.5.1. Grupos vibracionales de los 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 (Casal y Mantsch, 1984; Arrondo y col., 1993). La [Tabla II.2.](#) resume las principales vibraciones de los fosfolípidos.

2.5.1.1. 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.2. 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	ν (CH ₃)
2923	CH ₂ tensión antisimétrica	ν_{as} (CH ₂)
2870	CH ₃ tensión simétrica	ν_s (CH ₃)
2853	CH ₂ tensión simétrica	ν_s (CH ₂)
2195	CD ₂ tensión antisimétrica	ν_{as} (CD ₂)
2090	CD ₂ tensión simétrica	ν_s (CD ₂)
1750-1600	C=O tensión	ν (C=O)
1380	CH ₃ deformación simétrica	δ_s (CH ₃)
1220-1240	PO ²⁻ tensión antisimétrica	ν_{as} (PO ²⁻)
1160-1170	C-O tensión antisimétrica	ν_{as} (CO-O-C)
1090	PO ²⁻ tensión simétrica	ν_s (PO ²⁻)
1070	R-O-P-O-R' tensión	ν_{as} (C-O-PO ²⁻)

2.5.1.2. Región interfacial.

Las bandas más importantes originadas en la región interfacial de los lípidos aparecen en la región 1750-1600 cm⁻¹ y se deben a las vibraciones de tensión del grupo carbonilo involucrado en el enlace éster, ν (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 ν (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).

2.5.1.3. Cabeza polar.

Las bandas vibracionales más características de la cabeza polar de los fosfolípidos son las que se originan a partir del grupo fosfato (PO²⁻). 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.

2.5.2. 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 (625 cm^{-1}), V (725 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.3).

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.

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%).

Tabla II.3. 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%), CN _d
VI	600	CO _{ob} , CN _t
VII	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 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 (D_2O). 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 H_2O , aparece ahora a 1215 cm^{-1} en D_2O 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 asignando 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 $CH_3-CO-(Ala)_4-NH-CH_3$, entre otros (Bandeekar, 1992).

La [Tabla II.4.](#) muestra las frecuencias asignadas a los componentes de la banda amida I en H_2O y en D_2O (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 H_2O a D_2O , 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 $1648-1658\text{ cm}^{-1}$ (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 3_{10} , 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).

Tabla II.4. Asignación de los componentes de la banda amida I a cada tipo de conformación estructural.

Asignación	Frecuencia (cm ⁻¹)	
	H ₂ O	D ₂ O
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

La estructura desordenada aparece a 1657 cm⁻¹ en H₂O, solapándose con la hélice α. En cambio, en D₂O 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 1660-1700 cm⁻¹ se encuentran diferentes bandas asignadas a giros de manera no específica (Krimm y Bandekar, 1980; Mantsch y col., 1993).

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.

2.5.2.1. 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 periodo 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 Ca_2F con espaciadores de teflón de $6\ \mu\text{m}$ (muestras en tampón H_2O) y $25\ \mu\text{m}$ (muestras en tampón D_2O) (Specac, Kent, Reino Unido) y se montaron en una célula termostatazada 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 los distintos 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 los distintos 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 los 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.15](#). se muestran los espectros completos del dominio C2 de la PKC γ (línea continua), de su tampón (línea discontinua) y de la sustracción (espectro inferior) en D₂O.

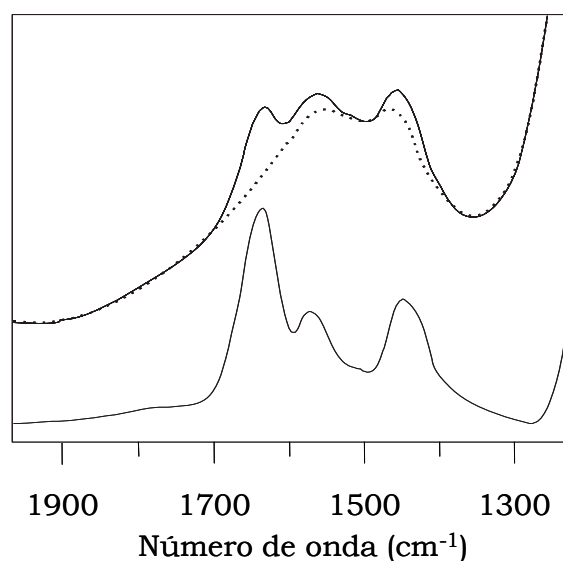


Figura II. 15. Espectros de infrarrojo del dominio C2 de PKC γ . En la parte superior se muestran los espectros obtenidos de la proteína (línea continua), de su tampón (línea discontinua), mientras que en la parte inferior aparece la sustracción de ambos en D₂O (Torrecillas y col., 2004).

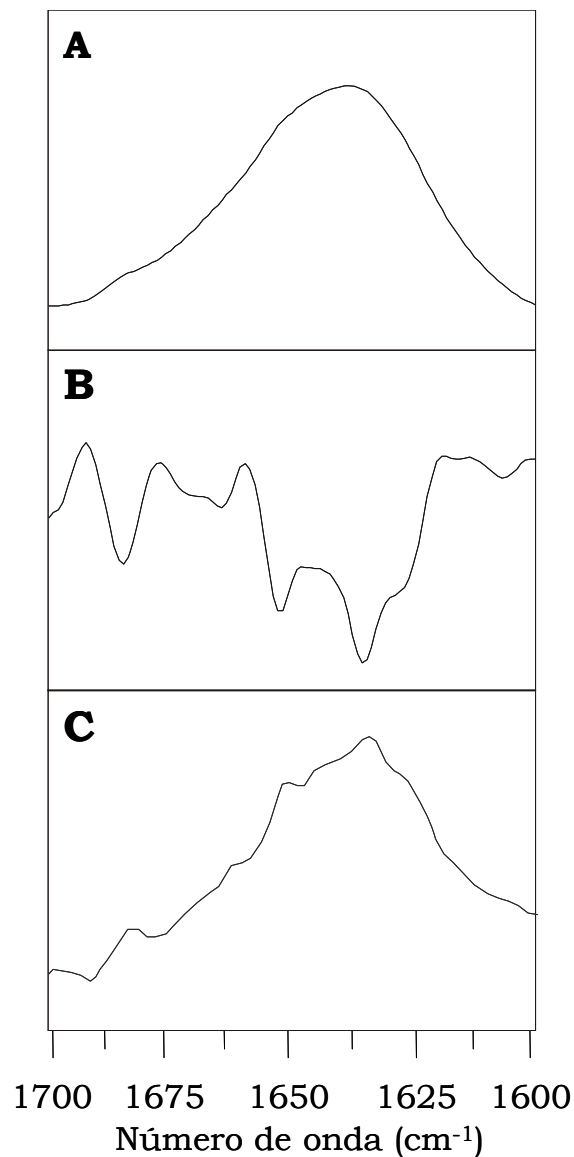


Figura II. 16. Espectros de infrarrojo del dominio C2 de PKC γ . Se muestra la banda amida I' de los espectros de la proteína en tampón D₂O (A), su segunda derivada (B) y su desconvolución (C) (Torrecillas y col., 2004).

En la [Figura II.16.](#) 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.

2.5.2.2. Obtención del porcentaje de intercambio H-D.

El rango de intercambio H-D fue cuantificado mediante el cálculo de la relación entre el área que comprende la banda amida II' entre la banda amida I' (Saba y col., 1999) (Figura II. 17) obteniéndose una media de un 83,8 % de intercambio en las muestras de estudio. Estos porcentajes se mantienen tras calentar a 80 °C siendo el porcentaje de intercambio ligeramente mayor, un 85,7%. Similares porcentajes se obtuvieron en presencia de Mg²⁺-ATP.

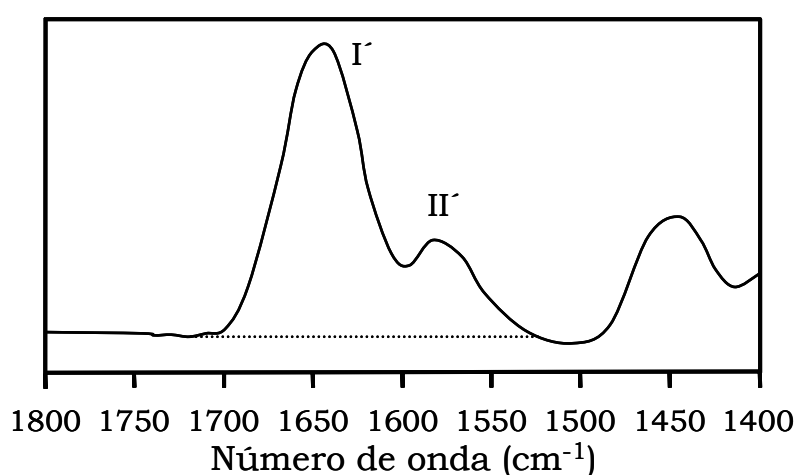


Figura II. 17. Espectro de infrarrojo del dominio catalítico de la PKC ζ . Se muestran las bandas amida I' y amida II' a partir de las cuales se realizó el cálculo del intercambio H-D.

2.5.2.3. 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.

2.5.2.3.1. Espectroscopía bidimensional basada en una perturbación.

La Figura II.18. 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.

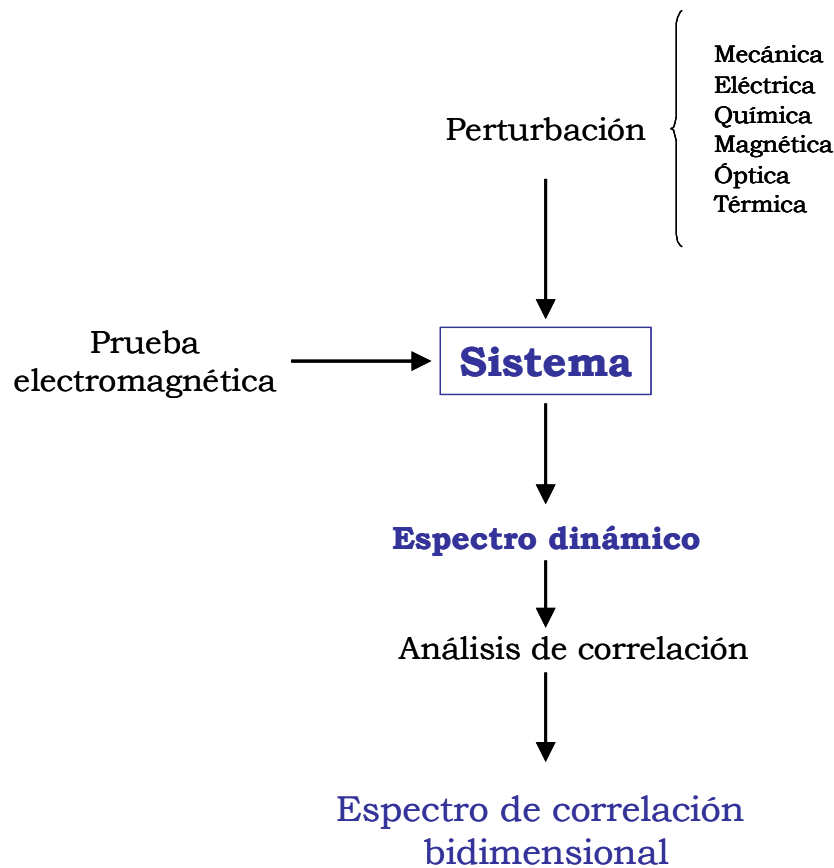


Figura II. 18. Esquema general para la obtención de un espectro de correlación bidimensional. Tomado de Noda y col. (2000).

2.5.2.3.2. 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 $T_{máx}$.

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 $\tilde{y}(\nu, t)$ de un sistema afectado por una perturbación externa se define formalmente como:

$$\tilde{y}(v,t) = \begin{cases} y(v,t) - \tilde{y}(v), & \text{para } T_{\text{máx}} \geq t \geq T_{\text{mín}} \\ 0, & \text{para el resto} \end{cases} \quad (1)$$

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:

$$\tilde{y}(v) = \frac{1}{T_{\text{máx}} - T_{\text{mín}}} \int_{T_{\text{mín}}}^{T_{\text{máx}}} y(v,t) dt \quad (2)$$

En algunos casos, es posible seleccionar el espectro de referencia como un espectro observado en un punto de referencia fijado ($t = T_{\text{ref}}$), 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 la 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 $T_{\text{mín}}$ y $T_{\text{máx}}$. 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 ν_1 y ν_2 lleva a la naturaleza bidimensional de este análisis de correlación particular.

Se adopta la convención de tratar $X(\nu_1, \nu_2)$ como el número complejo

$$X(\nu_1, \nu_2) = \Phi(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2) \quad (4)$$

el cual comprende dos componentes ortogonales (uno real y otro imaginario), conocidos como intensidad de correlación bidimensional *síncrona* y *asíncrona*, respectivamente. La intensidad de correlación bidimensional *síncrona* $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ 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* $\Psi(\nu_1, \nu_2)$ 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:

$$X(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{\pi(T_{\max} - T_{\min})} \int_0^{\infty} \tilde{Y}_1(\omega) \cdot \tilde{Y}_2^*(\omega) d\omega \quad (5)$$

El término $\tilde{Y}_1(\omega)$ es la transformación de Fourier de la variación de intensidad espectral $\tilde{y}(\nu_1, t)$ observada en la variable ν_1 y se define como

$$\tilde{Y}_1(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{y}(\nu_1, t) e^{-i\omega t} dt \quad (6)$$

La frecuencia de Fourier ω representa la componente de frecuencia individual de la variación de $\tilde{y}(\nu_1, t)$ 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 $\tilde{y}(\nu_2, t)$ observada en la variable ν_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 asíncrona es más complicada. Hay diferentes maneras de estimar el espectro asíncrono, siendo el método más eficiente y simple actualmente para estimar el espectro asíncrono 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 i de la matriz de transformación discreta de Hilbert-Noda dada por

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

2.5.2.3.3. Propiedades de los espectros de correlación bidimensional.

a) Espectro síncrono.

La intensidad de un espectro de correlación bidimensional síncrono $\Phi(\nu_1, \nu_2)$ 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.19. muestra un ejemplo esquemático de un espectro de correlación bidimensional síncrono 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.

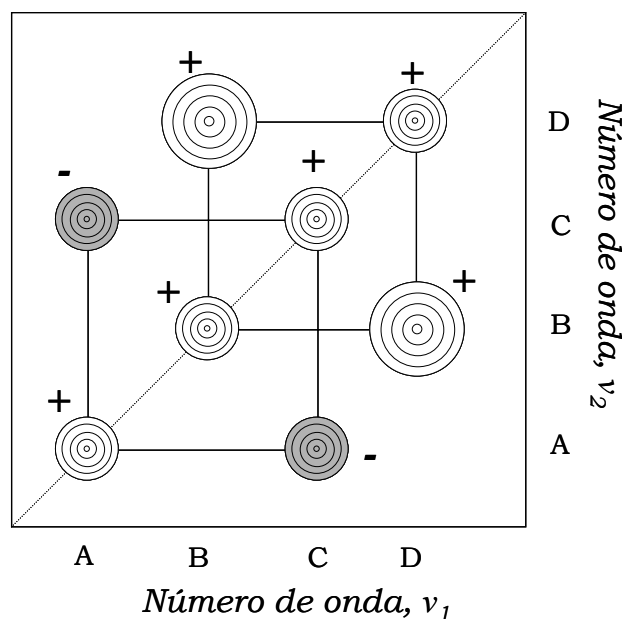


Figura II. 19. Esquema del mapa de contorno de un espectro de correlación síncrono. En la diagonal aparecen los autopicos, mientras que fuera de ella se encuentran los picos cruzados. El signo de los picos se muestra al lado de cada uno. Los picos de signo negativo aparecen sombreados, mientras que los 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.

Los picos localizados en la diagonal se denominan *autopicos* (en la Figura II.19., 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.19.](#), 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.20. muestra un ejemplo de espectro de correlación bidimensional asíncrono. La intensidad de un espectro asíncrono representa los cambios secuenciales de la 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 asíncrona uniendo los picos cruzados con las correspondientes posiciones de la diagonal. En el ejemplo, se observa correlación asíncrona entre las bandas A y B, A y D, B y C y C y D. Así, podemos formar cuatro cuadrados de correlación asíncrona entre los mismos.

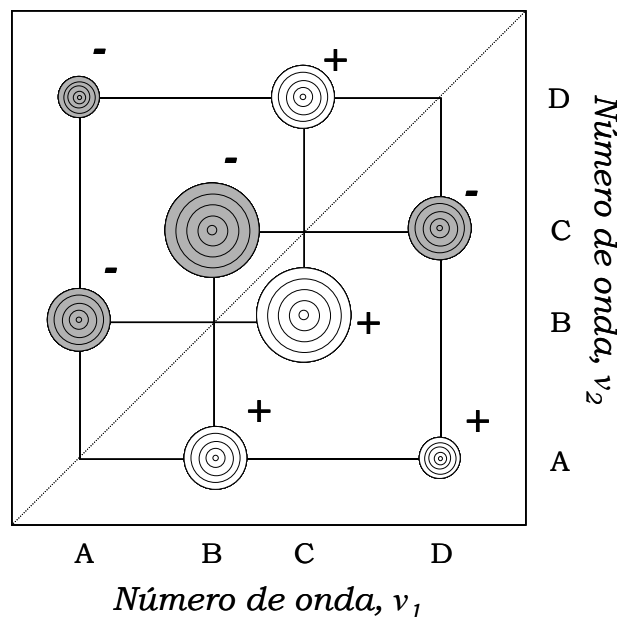


Figura II. 20. Esquema del mapa de contorno de un espectro de correlación asíncrono. Se muestran los picos cruzados, junto con su signo, fuera de la diagonal. Los picos negativos aparecen sombreados, mientras que los positivos aparecen de blanco. A su vez, se representan los cuatro posibles cuadrados de correlación, entre los números de onda A-B, A-D, B-C y C-D.

Los picos cruzados de correlación asíncrona 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.

El signo de un pico cruzado asíncrono 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.20](#). y teniendo en cuenta el mapa de contorno del espectro de la correlación síncrona ([Figura II.19](#)), los cambios en la intensidad de las bandas A y C ocurren después de los cambios en B y D.

1. RESUMEN.

El dominio C2 de las PKC clásicas es un dominio diana que responde a señales de Ca²⁺ intracelulares y que interviene en la localización de la proteína en la membrana. Estudios recientes han revelado una nueva región en el dominio C2, la región rica en lisinas, la cual interacciona con fosfolípidos ácidos. El propósito de este trabajo ha sido caracterizar el mecanismo molecular por el cual el PtdIns(4,5)P₂ interacciona específicamente con este motivo. Utilizando una combinación de técnicas de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y de transferencia de energía de fluorescencia (FRET) hemos llevado a cabo un estudio exhaustivo a cerca de la afinidad que presenta el dominio C2 de la PKC α por este fosfoinosítido así como cuál es la región del dominio implicada en la interacción. Los resultados mostraron que este dominio es capaz de unirse a una molécula de PtdIns(4,5)P₂ (n : 0,72 \pm 0,012) con mayor afinidad en presencia de Ca²⁺ (K_D : 1,85 \pm 0,35 μ M) que en ausencia (K_D : 48,3 \pm 9,7 μ M).

La utilización de diversos mutantes nos ayudaron a determinar qué regiones del dominio C2 se encontraban implicadas en el proceso de unión a PtdIns(4,5)P₂: la región de unión de calcio (C2 α -D246N/D248N) o la región rica en lisinas (C2 α -K197A/K199A; C2 α -K209A/K211A). El mutante de la región de unión de calcio presentó un comportamiento interesante, ya que en presencia de Ca²⁺, mostraba una menor afinidad para unirse a PtdIns(4,5)P₂ (K_D : 26,5 \pm 5,02 μ M) con respecto al dominio silvestre, sin embargo, aún en estas condiciones se encontraba una molécula de PtdIns(4,5)P₂ unida al dominio C2 (n :0,83 \pm 0,07). Posteriormente, se estudiaron los mutantes de la región rica en lisinas y se observó que el dominio era incapaz de unirse a PtdIns(4,5)P₂ aún en presencia de Ca²⁺. Estos datos reflejan que el dominio C2 interacciona con el PtdIns(4,5)P₂ a través de la región rica en lisinas de un modo dependiente de Ca²⁺, estando por tanto, ambas regiones implicadas en el proceso de interacción a dicho fosfoinosítido.

Por otro lado, quisimos llevar a cabo una comparación acerca de las afinidades por diversos tipos de fosfoinosítidos distintos del PtdIns(4,5)P₂ y en presencia de Ca²⁺ saturante (100 μ M). Los resultados demostraron que la afinidad de unión para el PtdIns(4,5)P₂ es mucho mayor que para el resto de estos fosfoinosítidos estudiados.

Por último, se estudió si existía cooperatividad entre POPS y PtdIns(4,5)P₂ observando que la alta afinidad que presenta el dominio C2 de la PKC α se debe sólo y exclusivamente al PtdIns(4,5)P₂.

2. INTRODUCCIÓN.

El PtdIns(4,5)P₂ (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato) es el fosfoinosítido más abundante en la membrana plasmática de células de mamífero típicas (representa el 1% del lípido total) (Stephens y col., 1993). Una de las funciones más relevantes que el PtdIns(4,5)P₂ desempeña es que sirve de fuente de tres segundos mensajeros: el Ins(3,4,5)P₃ (inositol-1,4,5-trisfosfato), el DAG (diacilglicerol) y el PtdIns(3,4,5)P₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato), los cuales a su vez desencadenan un amplio rango de eventos que tienen lugar en la membrana (Czech, 2000; Caroni, 2001; McLaughlin y col., 2002; Lemmon, 2003; McLaughlin y Murray, 2005). Recientemente, se han identificado nuevas especies de fosfoinosítidos y cada vez se está confirmando más que los fosfolípidos de inositol son capaces, por sí mismos, de desempeñar funciones implicadas en la señalización celular (Wenk y De Pietro, 2004; Downes y col., 2005). En esto último, el PtdIns(4,5)P₂ no es una excepción ya que se ha observado que se une a un número creciente de dominios reguladores y que por tanto parece ser un regulador importante en funciones tales como exocitosis, endocitosis, complejos de adhesión focal, procesos de polimerización de actina y canales iónicos en la membrana plasmática entre otros (para recientes revisiones, Downes y col., 2005; McLaughlin y Murray, 2005; McLaughlin, 2006). Además, también es de destacar el papel que desempeña el PtdIns(4,5)P₂ a nivel de núcleo, de manera que parece que está implicado en la progresión del ciclo celular, en la apoptosis, en la remodelación de la cromatina así como en la regulación transcripcional y en el procesamiento del ARN mensajero (para revisión, Bunce y col., 2006).

Se han descrito varios mecanismos implicados en la interacción del PtdIns(4,5)P₂ con la proteína a la que se une, en cada uno de éstos se exhiben diferentes grados de especificidad y afinidad. En algunos casos, estas proteínas interactúan con el fosfoinosítido a través de un mecanismo electrostático que implican regiones de residuos básicos unidos a la membrana que lateralmente secuestran el lípido ácido multivalente ($z=-4$) del PtdIns(4,5)P₂, sin embargo estas proteínas no comparten un plegamiento estructural común (McLaughlin y col., 2002; McLaughlin y Murray, 2005) éste es el caso de proteínas como las que constituyen la Familia WASP, proteínas de unión a actina, GAP43, CAP23 y MARCKS (Toker, 1998; Lemmon, 2003; Yin y Janmey, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que tres

tipos de dominios son capaces de unirse a este lípido con un grado variable de especificidad, éste es el caso de las proteínas que contienen los dominios ENTH (proteínas de la familia de las epsinas), dominios FERM (proteínas de la familia Ezrina/Moesina/Radixina) y dominios PH (Lemmon, 2003; Parker, 2004; Roth, 2004; Cho y Stahelin, 2005). Así, el dominio PH de la PLC δ , es uno de los más ampliamente utilizados como prueba para estudiar la dinámica del PtdIns(4,5)P $_2$ en las células (Stauffer y col., 1998; Nahorski y col., 2003).

Las proteínas quinasas C (PKC) son una amplia familia de serina-treonina quinasas dependientes de fosfolípidos, las cuales son activadas por muchas señales extracelulares y juegan un papel crítico en distintas vías de señalización en las células (Nishizuka, 1995; Newton, 2001; Ohno y Nishizuka, 2002). Las isoenzimas descubiertas en células de mamífero se agrupan en tres subfamilias de acuerdo a sus propiedades enzimáticas (Hofmann, 1997; Mellor y Parker, 1998). El primer grupo se denomina subfamilia de isoenzimas *clásicas o convencionales* e incluyen las isoenzimas α , β I, β II y γ , caracterizadas por contener dominios C1 y C2 conservados en la región reguladora. Estas isoenzimas están reguladas por DAG y de una forma cooperativa por Ca $^{2+}$ y por fosfolípidos ácidos como fosfatidilserina (POPS) (Newton y Johnson, 1998). El dominio C2 de la PKC α ha sido nuestro dominio de estudio en el presente capítulo.

El dominio C2 es un motivo regulador que contiene unos 130 aminoácidos aproximadamente y se encuentra en una amplia variedad de proteínas eucarióticas implicadas en muchos y distintos procesos celulares que incluyen transducción de señales intracelulares y tráfico de moléculas en la membrana (Nalefski y Falke, 1996; Rizo y Sudhof, 1998; Cho y Stahelin, 2005). Todos los dominios C2 comparten, un plegamiento general común consistente en un solo motivo compacto organizado en una estructura en β -sandwich constituido por 8 hojas β -antiparalelas con una serie de bucles flexibles tanto en la parte superior como en la base del dominio, tal y como se deduce de sus estructuras obtenidas por técnicas difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear (Nalefski y Falke, 1996; Rizo y Sudhof, 1998; Verdaguer y col., 2004) (Ver [Figura I.10.](#) del Capítulo I de la presente Memoria).

En los dominios C2 que unen Ca^{2+} , como es el caso de las PKC clásicas, la *región de unión de calcio* se encuentra localizada en los bucles de la superficie y unen 2 ó 3 iones Ca^{2+} (Sutton y Sprang, 1998; Verdaguer y col., 1999; Kohout y col., 2002; Ochoa y col., 2002). Se ha demostrado que los fosfolípidos aniónicos se unen al dominio C2 de la PKC α en dos localizaciones distintas, una de ellas en la *región de unión de calcio*, donde POPS interacciona con uno de los iones Ca^{2+} , denominado Ca1, que actúa como puente entre la proteína y la membrana lipídica lo que explicaría la alta cooperatividad observada por el dominio C2 para unirse a membranas que contienen fosfatidilserina de un modo dependiente de calcio (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). El segundo sitio se denomina *región rica en lisinas* y se localiza en las hojas $\beta 3$ y $\beta 4$ (Ochoa y col., 2002) (Ver Figura I.10. del Capítulo I de esta Memoria). Experimentos preliminares *in vitro* y en células sugieren que el dominio C2 de la PKC α podría estar implicado en las interacciones diferenciales con POPS y PtdIns(4,5)P $_2$ a través de la *región de unión de calcio* y de la *región rica en lisinas*, respectivamente (Corbalán-García y col., 2003a; Marín-Vicente y col., 2005).

Se ha demostrado en trabajos previos en nuestro laboratorio que en células dPC12 esta *región rica en lisinas* es esencial para la localización de la PKC α cuando el flujo de Ca^{2+} se genera mediante la estimulación con ATP (Marín-Vicente y col., 2005). El uso combinado de inhibidores específicos de la fosfolipasa C y mutagénesis dirigida de los residuos críticos implicados en la *región rica en lisinas* mostraron que la persistencia del PtdIns(4,5)P $_2$ en la membrana plasmática aumenta la permanencia de la enzima en la bicapa lipídica, siendo los residuos de lisina localizados en este motivo esenciales para la apropiada localización de la PKC α a la membrana (Marín-Vicente y col., 2005). Además, estudios recientes han confirmado que la *región rica en lisinas* está implicada en la localización de la PKC α a la membrana plasmática cuando células MDCK se trataron con ionomicina con el fin de aumentar el Ca^{2+} citoplásmico (Evans y col., 2006). Sin embargo, en otros casos, se ha demostrado que la *región de unión de calcio* sólo es la responsable de la localización y activación de la PKC α , como es el caso de los lípidos ácido araquidónico y ácido todo-*trans*-retinoico (López-Andreo y col., 2005; López-Nicolás y col., 2006).

En este trabajo, hemos realizado experimentos de ITC y FRET *in vitro* con el fin de caracterizar los mecanismos moleculares de

interacción del dominio C2 de la PKC α a PtdIns(4,5)P₂ (número de moléculas de PtdIns(4,5)P₂ implicadas, grado de especificidad por el PtdIns(4,5)P₂) además de conocer el efecto de las mutaciones en la *región rica en lisinas* en la unión de calcio y PtdIns(4,5)P₂.

3. RESULTADOS.

3.1. ANÁLISIS DE ITC.

3.1.1. Unión del dominio C2 de la PKC α a PtdIns(4,5)P₂ en presencia y ausencia de calcio.

La *región rica en lisinas* del dominio C2 se encuentra localizada en un área bastante lejana de los bucles que componen la parte superior del dominio y que están implicados en el proceso de unión de calcio, la denominada *región de unión de calcio* (Ver [Figura I.10.](#) del Capítulo I de la presente Memoria). Para estudiar el papel que desempeña el calcio en la interacción a fosfoinosítidos, estudiamos y caracterizamos las propiedades termodinámicas de la unión del PtdIns(4,5)P₂ al dominio C2 de la PKC α a 25°C tanto en ausencia como en presencia de Ca²⁺. Para ello, utilizamos la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC), utilizando un microcalorímetro VP-ITC (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.).

Para valorar la unión del dominio C2 de la PKC α silvestre a PtdIns(4,5)P₂ se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por fosfatidilcolina (POPC) y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂). La relación molar de la mezcla fue POPC/PtdIns(4,5)P₂ (95:5). Una vez que en trabajos previos había quedado demostrado que el dominio C2 se une a fosfolípidos aniónicos, la concentración de lípido total se normalizó usando el porcentaje de PtdIns(4,5)P₂ presente en las mezclas (5%) y teniendo en cuenta que sólo la monocapa externa de las vesículas utilizadas (un 57 % del lípido total) puede establecer interacciones con la proteína. Se analizó la unión del dominio C2 de la PKC α a PtdIns(4,5)P₂ 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 6:1 y en estas condiciones el dominio se encuentra prácticamente saturado con dicho ión.

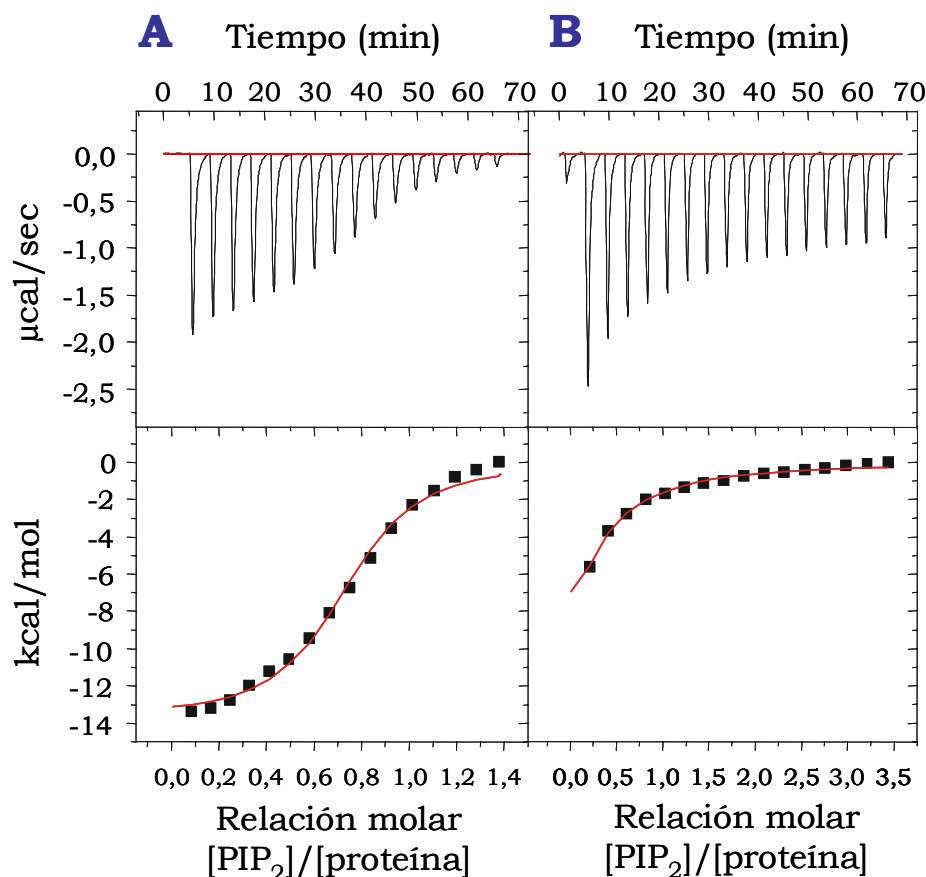


Figura III.1. El dominio C2 de la PKC α se une con alta afinidad a PtdIns(4,5)P₂ en presencia de Ca²⁺.

Se determinó la afinidad del dominio C2 de la PKC α silvestre para unirse a vesículas que contenían PtdIns(4,5)P₂ mediante ITC, utilizando vesículas unilamelares pequeñas (SUV) que contenían una mezcla de POPC/PtdIns(4,5)P₂ 10 mM (relación molar 95:5) a 25 °C. La titulación se realizó tanto en presencia de 1 mM de Ca²⁺ (A) como en ausencia (B). La celda de la muestra contenía el dominio C2 de la PKC α (60 μ M) preparado en tampón Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM. La disolución que contenía las vesículas se cargó en una jeringa de ~290 μ l y se añadió a la celda de la muestra en 17 inyecciones de 1 μ l la primera y de 15 μ l las restantes, en intervalos de 4 min, con una velocidad de inyección de 1 μ l/seg y una agitación de 250 rpm. Todos los tampones utilizados, así como la proteína, se pasaron por columnas con Chelex-100 (Sigma) para eliminar el Ca²⁺ contaminante. En presencia de Ca²⁺, se añadió 1 mM de CaCl₂ tanto a la proteína como a las vesículas. Se utilizó un factor de corrección del 57% para calcular el PtdIns(4,5)P₂ disponible para la unión del dominio C2. La celda de referencia contenía el mismo tampón en el que iban disueltos la proteína y las vesículas. 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 de color rojo 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.). Los parámetros termodinámicos del proceso de unión del dominio C2 α a PtdIns(4,5)P₂ se muestran en la [Tabla III.1](#). y proceden de al menos tres experimentos independientes.

Los resultados experimentales de la unión del dominio C2 a PtdIns(4,5)P $_2$ se ajustaron al *modelo de un tipo de sitios de unión* (Origin 5.0, Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) ya que otros modelos teóricos del citado programa no mejoraron los resultados comentados a continuación.

Tabla III.1. Parámetros termodinámicos de la unión de los dominios C2 α -WT, tanto en ausencia como en presencia de Ca $^{2+}$ 1mM, y del mutante implicado en la región de unión de calcio C2 α -D246N/D248N también en presencia de Ca $^{2+}$ saturante a vesículas SUV compuestas por POPC/PtdIns(4,5)P $_2$ (relación molar 95:5). Se muestran los resultados obtenidos mediante el *modelo de un tipo de sitio de unión* 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 (μ M)	ΔH° (kcal/mol)	ΔS° (cal/mol·K)	ΔG° (kcal/mol)
C2 α -WT - Ca $^{2+}$	n_I : 0,07 \pm 0,04	48,3 \pm 9,7	-6,99 \pm 0,18	-214,3 \pm 9,2	-5,9 \pm 0,9
C2 α -WT + Ca $^{2+}$	n_I : 0,72 \pm 0,01	1,85 \pm 0,35	-12,34 \pm 0,32	-20,3 \pm 1	-7,8 \pm 0,1
C2 α -D246N/D248N +Ca $^{2+}$	n_I : 0,83 \pm 0,07	26,5 \pm 5,02	-16,30 \pm 0,55	-33,73 \pm 3,5	-6,3 \pm 0,3

En presencia de Ca $^{2+}$ (Figura III.1A) se observó una fuerte interacción con el fosfoinosítido caracterizada por una constante de disociación aparente $K_D=1,85\pm 0,35 \mu$ M y un solo tipo de sitio de unión a PtdIns(4,5)P $_2$ $n=0,72\pm 0,01$, mientras que en ausencia de Ca $^{2+}$ (Figura III.1B) la interacción fue muy débil siendo la $K_D=48,3\pm 9,7 \mu$ M. Por otro lado, la unión de tipo exotérmico, se estabilizó principalmente por contribuciones entálpicas, con una $\Delta H=-12,34\pm 0,32$ kcal/mol y $\Delta H=-6,99\pm 0,18$ kcal/mol, en presencia y ausencia de Ca $^{2+}$ respectivamente (Tabla III.1).

Estos resultados preliminares nos indican que el dominio C2 de la PKC α es capaz de unirse a una molécula de PtdIns(4,5)P $_2$ de un modo dependiente de calcio.

Debido a la estructura de este dominio y a la dependencia de calcio del proceso en sí, esta molécula podría acomodarse por sí misma en dos posibles lugares: en la *región de unión de calcio* o en la *región rica en residuos de lisina* (Figura III.2) (Bolsover y col., 2003;

Corbalán-García y col., 2003a; Rodríguez-Alfaro y col., 2004; Marín-Vicente y col., 2005). Para estudiar el papel de estos dos motivos en la unión de PtdIns(4,5)P₂ dependiente de calcio, utilizamos diferentes mutantes específicos de cada una de las regiones anteriores.

3.1.2. Papel de la *región de unión de calcio* en la interacción C2 α -PtdIns(4,5)P₂.

Por un lado, con el propósito de estudiar el papel de la *región de unión de calcio* (Figura III.2A), utilizamos un mutante clave en el proceso de unión de calcio: C2 α -D246N/D248N. Este mutante presenta dos residuos de aspártico sustituidos por dos residuos de asparagina en tales posiciones, ya que estas mutaciones disminuyen la afinidad aparente por el Ca²⁺ (Corbalán-García y col., 1999).

La curva de valoración de la unión de este dominio C2 α -D246N/D248N a PtdIns(4,5)P₂ se muestra en la Figura III.2B. De nuevo se utilizaron vesículas unilamelares pequeñas compuestas por POPC/PtdIns(4,5)P₂ (relación molar 95:5). En este caso, la constante de disociación aparente K_D calculada por ITC aumentó a 26,55 \pm 5,01 μ M pero, sorprendentemente aún se encontraba unida al dominio C2 una molécula de PtdIns(4,5)P₂ ($n=0,83\pm 0,077$) (Figura III.2B y Tabla III.1) sugiriendo así que en ausencia de calcio, la afinidad de unión por dicho fosfoinosítido disminuye pero la molécula de PtdIns(4,5)P₂ aún puede acceder al sitio de unión del dominio.

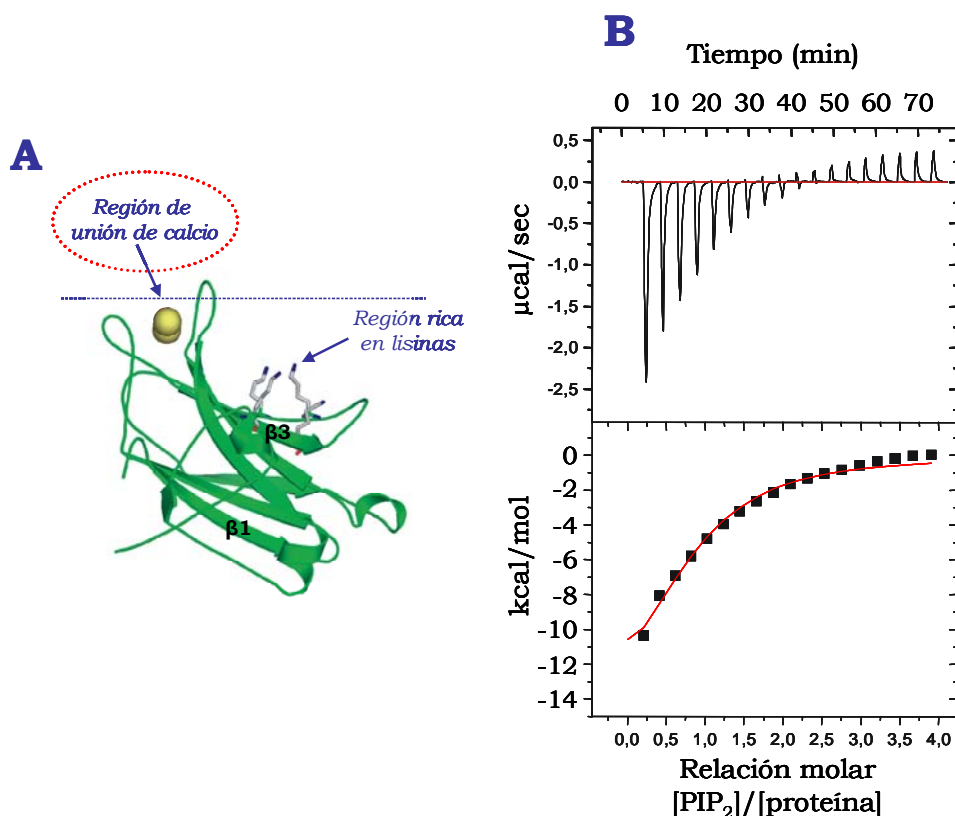


Figura III.2. EL mutante de la región de unión de calcio (A) (C2 α -D246N/D248N) no afecta la interacción del dominio a PtdIns(4,5)P $_2$ aunque sí disminuye la afinidad. Se muestra la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α , donde se distingue la región del dominio estudiada (línea punteada roja) (A). Se utilizó la técnica calorimétrica de ITC para estudiar la afinidad del dominio C2 de la PKC α mutado en la *región de unión de calcio*, C2 α -D246N/D248N, a PtdIns(4,5)P $_2$. La titulación se llevó a cabo en presencia de 1 mM de Ca $^{2+}$ utilizando una disolución de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/PtdIns(4,5)P $_2$ a una concentración de 30 mM (relación molar 95:5) a 25°C. Las vesículas se prepararon en el mismo tampón que el de la proteína. La celda de la muestra contenía el dominio C2 mutado de la PKC α (60 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 el mismo tampón en el que iban disueltos la proteína y las vesículas. La disolución se cargó en una jeringa de ~290 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 de las vesículas (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 un tipo de sitios de unión* del programa Origin 5.0 (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.). Los parámetros termodinámicos del proceso de unión del dominio C2 α a PtdIns(4,5)P $_2$ se muestran en la [Tabla III.1](#). y proceden de al menos tres experimentos independientes.

3.1.3. Papel de la *región rica en lisinas* en la interacción C2 α -PtdIns(4,5)P₂.

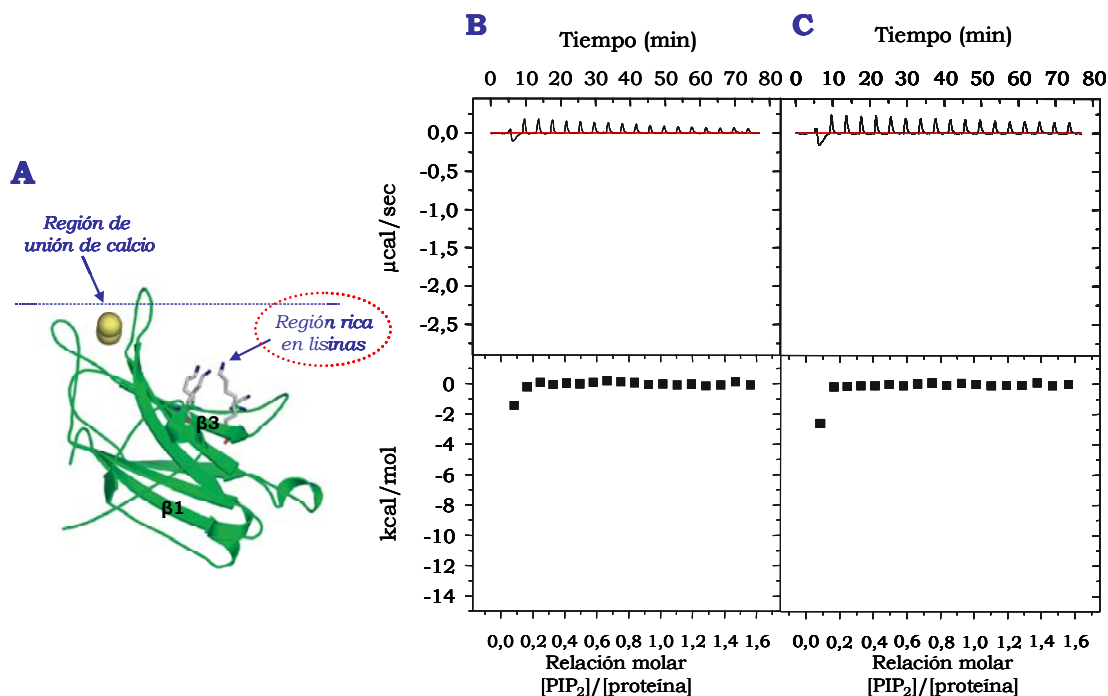


Figura III.3. El dominio C2 de la PKC α se une a PtdIns(4,5)P₂ a través de la *región rica en lisinas*. Se muestra la estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC α donde se distingue la región del dominio estudiada (línea punteada roja) (A). Se utilizó la técnica calorimétrica de ITC para estudiar la afinidad a PtdIns(4,5)P₂ de los dominios C2 de la PKC α mutados en la *región rica en lisinas* bien en la hoja β 3 (C2 α -K197A/K199A) (B) o bien en la hoja β 4 (C2 α -K209A/K211A) (C). La titulación se llevó a cabo en presencia de 1 mM de Ca²⁺ utilizando una disolución de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/PtdIns(4,5)P₂ a una concentración de 10 mM (relación molar 95:5) a 25°C. Las vesículas se prepararon en el mismo tampón que el de la proteína. La celda de la muestra contenía el dominio C2 mutado de la PKC α (60 μ M) preparado en tampón Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM junto con CaCl₂ 1 mM. La celda referencia el mismo tampón en el que se encontraban disueltos la proteína y las vesículas. La disolución se cargó en una jeringa de ~290 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 de las vesículas (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 un tipo de sitios de unión* del programa Origin 5.0 (Microcal Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.).

Por otro lado, con el fin de estudiar el papel de la *región rica en lisinas* (Figura III.3A), utilizamos dos mutantes que tenían la función

anulada tanto en la hoja β 3 (C2 α -K197A/K199A) como en la hoja β 4 (C2 α -K209A/K211A).

Para ello, estudiamos las propiedades termodinámicas de unión de estos dos mutantes a vesículas unilamelares pequeñas compuestas por POPC/PtdIns(4,5)P₂ (relación molar 95:5) a 25°C y en presencia de calcio. Tanto en el mutante de la hoja β 3 como en el mutante de la hoja β 4, no se observó unión a PtdIns(4,5)P₂ en presencia de calcio (Figuras III.4B y III.4C), sugiriendo que estos residuos de lisina juegan un papel clave en la interacción directa del dominio C2 con PtdIns(4,5)P₂.

3.1.4. Valoración de la unión de calcio.

Para estudiar la posibilidad de que esta mutagénesis en la *región rica en lisinas* pudiera afectar directamente a la unión de Ca²⁺, medimos la termodinámica de unión de Ca²⁺ para los mutantes C2 α -K197A/K199A y C2 α -K209A/K211A y con fin comparativo, también estudiamos la termodinámica de unión para el dominio silvestre.

Dado que se conoce tanto la zona del dominio C2 de la PKC α que interacciona con Ca²⁺ así como la forma en que lo hace (Torrecillas y col., 2004), los resultados experimentales obtenidos se ajustaron al *modelo de dos tipos de sitios de unión* (Origin 5.0, Microcal Software Inc., Northampton, MA, E.E.U.U.) por ser el que mejor reprodujo las curvas de titulación de Ca²⁺ obtenidas.

Las curvas de valoración de la unión del dominio C2 de la PKC α tanto silvestre como los mutantes de la *región rica en lisinas* fueron muy parecidas tal y como se muestran en la Figura III.4. El ajuste de los datos muestra la existencia de dos tipos de sitios, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad, presentando constantes de afinidad y sitios de unión muy similares en los tres dominios estudiados (Tabla III.2). Asimismo, mientras que el primer tipo de sitio une Ca²⁺ de modo exotérmico, con un cambio de entalpía de $\Delta H = -291$ cal/mol, $\Delta H = -264$ cal/mol y $\Delta H = -337$ cal/mol para los dominios silvestre, C2 α -K197A/K199A y C2 α -K209A/K211A respectivamente, el segundo tipo de sitio une Ca²⁺ de forma endotérmica, con unos cambios de entalpía $\Delta H = +1123$ cal/mol (silvestre), $\Delta H = +974$ cal/mol (C2 α -K197A/K199A) y $\Delta H = +1747$ cal/mol (C2 α -K209A/K211A) (Tabla III.2).

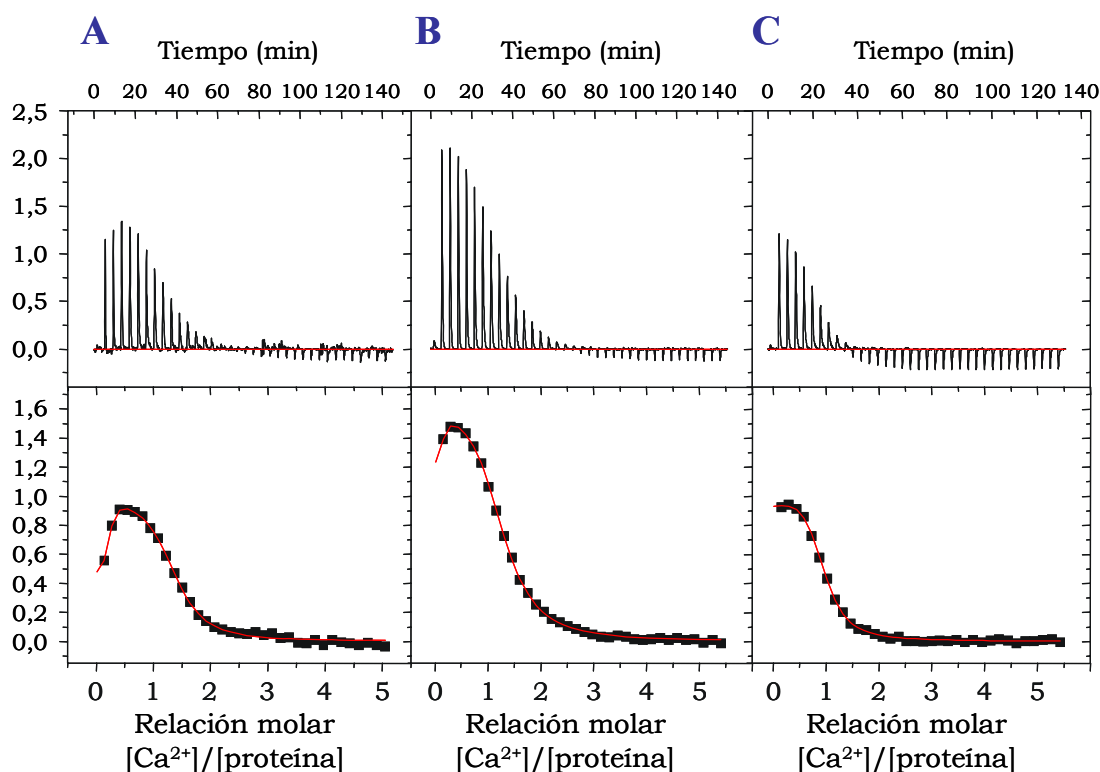


Figura III.4. Valoración calorimétrica del dominio C2 de la PKC α silvestre (A) y de los mutantes de la región rica en lisinas (C2 α -K197A/K199A) (B) y C2 α -K209A/K211A) (C) con Ca $^{2+}$ a 25°C. La celda de la muestra contenía el dominio C2 silvestre o mutado ($\sim 250 \mu\text{M}$) preparado en 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 de referencia contenía el mismo tampón en el que iban disueltos la proteína y la disolución de Ca $^{2+}$. La disolución de CaCl $_2$ estándar (6 mM) se cargó en una jeringa de 290 μl y se añadió a la celda de la muestra en 36 inyecciones de 1 μl la primera y de 8 μl las restantes, en intervalos de 4 min, con una velocidad de inyección de 1 $\mu\text{l}/\text{seg}$ 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 $^{2+}$ de cada uno de los dominios se muestran en la [Tabla III.2.](#) y provienen de al menos tres experimentos independientes.

El hecho de obtener un valor tan bajo en cuanto al número de moléculas para el sitio de alta afinidad puede deberse a que dicho sitio, debido a su alta afinidad por Ca $^{2+}$, estuviera parcialmente saturado antes de comenzar la titulación, a pesar del tratamiento previo con una resina quelante de Ca $^{2+}$ (Chelex-100) al que fueron sometidas las proteínas y las disoluciones tampón utilizadas.

Tabla III.2 Parámetros termodinámicos de la unión de Ca²⁺ en el C2 α -WT, C2 α -K197/199A y C2 α -K209/211A a 25°C. Se muestran los resultados 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 (μ M)	ΔH° (cal/mol)	ΔS° (kcal/mol·K)	ΔG° (kcal/mol)
C2 α -WT	n_1 : 0,14 \pm 0,04	0,76 \pm 0,43	-291 \pm 36	29 \pm 0,2	-8,9 \pm 0,1
	n_2 : 1,01 \pm 0,03	21,4 \pm 2	1123 \pm 42	25,1 \pm 0,4	-6,4 \pm 0,2
C2 α -K197A/K199A	n_1 : 0,12 \pm 0,05	1,16 \pm 0,25	-264 \pm 30	24,8 \pm 1	-7,6 \pm 0,05
	n_2 : 0,9 \pm 0,02	13,3 \pm 0,03	974 \pm 23	25,6 \pm 0,5	-6,6 \pm 0,1
C2 α -K209A/K211A	n_1 : 0,13 \pm 0,06	1,5 \pm 0,02	-337 \pm 26	24,7 \pm 2,4	-7,7 \pm 0,5
	n_2 : 1,11 \pm 0,12	22,4 \pm 0,13	1747 \pm 67	27 \pm 0,1	-6,3 \pm 0,1

Esta similitud en los datos, demuestran que las mutaciones en los residuos de lisina de las hojas β 3 y β 4 no influyen en la afinidad aparente del dominio C2 por el calcio confirmando así que los efectos observados sólo se deben a la interacción del PtdIns(4,5)P₂ con la *región rica en lisinas*.

Por tanto, el conjunto de estos resultados nos permiten afirmar que el PtdIns(4,5)P₂ interacciona con el dominio C2 de la PKC α de un modo dependiente de Ca²⁺ a través de una vía totalmente distinta a la previamente descrita para otros lípidos como la fosfatidilserina (Verdaguer y col., 1999; Bolsover y col., 2003; Conesa-Zamora y col., 2001) o el ácido araquidónico (López-Nicolás y col., 2006).

3.2. ANÁLISIS DE FRET.

3.2.1. Valoración de la sustitución de varios aminoácidos en la afinidad de unión a PtdIns(4,5)P₂ en presencia y ausencia de calcio mediante FRET.

3.2.1.1. Región rica en lisinas.

Debido a la importancia de los hallazgos obtenidos por ITC, utilizamos la técnica de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para estudiar cómo el Ca²⁺ modula la interacción del dominio C2 en vesículas que contienen PtdIns(4,5)P₂.

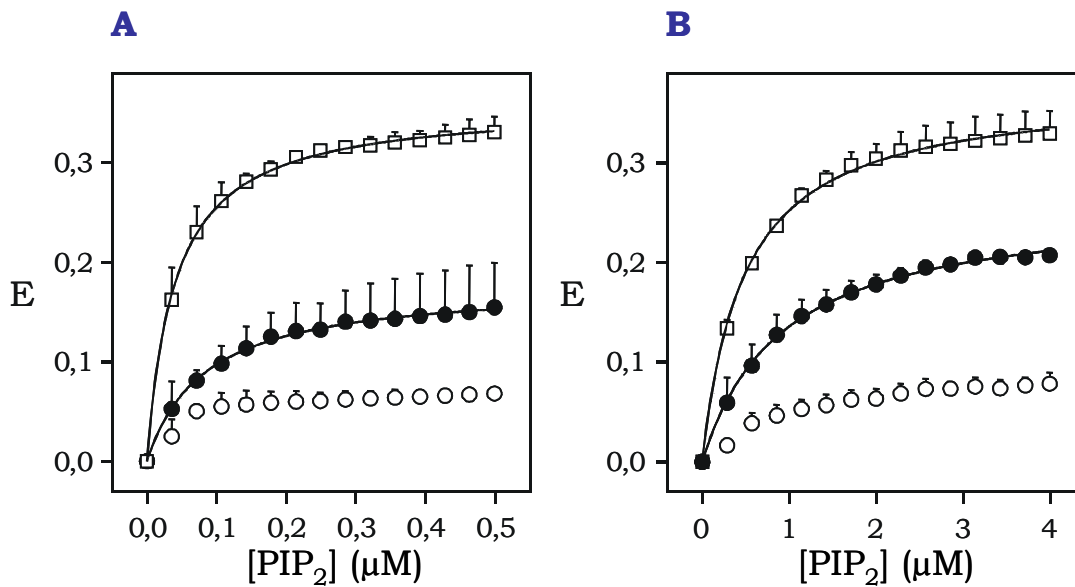


Figura III.5 Efecto de la sustitución de varios aminoácidos de la *Región rica en lisinas* en la afinidad de unión a PtdIns(4,5)P₂ en presencia (A) y ausencia de Ca²⁺ (B).

Se llevaron a cabo las valoraciones de unión de los dominios C2 (8 μM) de la PKCα tanto C2α-silvestre (□) como los mutantes implicados en la *región rica en lisinas*: C2α-K197A/K199A (●) y C2α-K209A/K211A (○) a vesículas unilamelares pequeñas compuestas por POPC/PtdIns(4,5)P₂/dPE (relación molar 90:5:5) tanto en presencia de Ca²⁺ 100 μM (A) como en ausencia de dicho ión (B) y a 25 °C. Para todos los casos, el tampón utilizado fue: Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM. 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 los dominios C2 aislados a PtdIns(4,5)P₂ se determinó mediante la variación de la fluorescencia intrínseca del Trp en función de la concentración de dicho fosfoinosítido. La fluorescencia intrínseca del Trp se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 284 nm (λ_{ex}) 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 vesículas que no contenían PtdIns(4,5)P₂. Asimismo, se analizó otra cubeta con tampón pero sin dominio C2 donde se añadieron las diferentes inyecciones de vesículas con PtdIns(4,5)P₂ 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 PtdIns(4,5)P₂. En la figura 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.

Para determinar las afinidades de unión del dominio C2 de la PKCα y de los diferentes dominios mutantes al PtdIns(4,5)P₂, se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia en equilibrio cuantificando la transferencia de energía entre los residuos de 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. El dominio C2 presenta cuatro residuos de Trp conservados en la estructura primaria (Trp 223, Trp 245, Trp 247 y Trp 274). Los residuos Trp 245 y Trp 247 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).

Las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) utilizadas contenían una mezcla de fosfatidilcolina (POPC) y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂), así como una pequeña cantidad de fosfatidiletanolamina marcada con dansilo (d-PE). Las mezclas preparadas contenían la relación molar (POPC/PtdIns(4,5)P₂/d-PE) (90:5:5). 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.

Cada dominio se sometió a una titulación con concentraciones crecientes de PtdIns(4,5)P₂. Los resultados obtenidos se representaron en función de la concentración de PtdIns(4,5)P₂ accesible para el dominio C2 (teniendo en cuenta el porcentaje de PtdIns(4,5)P₂ en la mezcla (5%) y que sólo la capa externa de la vesícula fosfolipídica es la que puede interaccionar con la proteína (~57%). Los datos resultantes de transferencia de energía de la proteína a la membrana se calcularon como se explicó ampliamente en el *Capítulo II* de la presente Memoria y se representaron frente a la concentración de PtdIns(4,5)P₂ disponible. Los valores medios de tres experimentos independientes se ajustaron mediante el modelo teórico de Hill.

En presencia de Ca²⁺, el valor de la constante de disociación aparente para el dominio C2 silvestre fue de K_D : 40±1,5 nM siendo el valor máximo de FRET de 0,32 ([Figura III.5A](#)). Sin embargo, cuando se estudiaron los mutantes pertenecientes a la *región rica en lisinas*, se observó un descenso importante en la unión a PtdIns(4,5)P₂ en el mutante de la hoja β 3: C2 α -K197A/K199A pero sobre todo en el mutante de la hoja β 4: C2 α -K209A/K211A. Cuando este mismo ensayo experimental se realizó en ausencia de Ca²⁺ ([Figura III.5B](#)) se produjo un descenso de 8 veces en la afinidad de unión del dominio C2 α silvestre a vesículas compuestas por PtdIns(4,5)P₂ siendo el valor de la constante aparente de disociación de K_D : 300±3,7 nM, e

igualmente, los mutantes de la *región rica en lisinas* exhibieron afinidades mucho más bajas que en el dominio silvestre bajo las mismas condiciones experimentales (Figura III.5B).

3.2.1.2. *Región de unión de calcio.*

Para una mayor profundización en el estudio de la unión del dominio C2 de la PKC α a membranas biológicas compuestas por PtdIns(4,5)P $_2$, se determinó la afinidad que presentaba el dominio C2 con los residuos implicados en el proceso de unión de calcio mutados (C2 α -D246N/D248N). 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. Se prepararon vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con la misma composición que la utilizada en el apartado anterior (POPC/PtdIns(4,5)P $_2$ /d-PE, relación molar 90:5:5). Estas vesículas se añadieron al dominio C2 aislado en ausencia y presencia de Ca $^{2+}$ saturante (Figura III.6). Los valores medios de tres experimentos independientes se ajustaron según la ecuación de Hill.

Bajo estas condiciones experimentales, el mutante con la *región de unión de calcio* anulada presentó una constante de afinidad aparente K_D : $0,16 \pm 0,02 \mu\text{M}$ y $0,33 \pm 0,05 \mu\text{M}$ en ausencia y en presencia de Ca $^{2+}$, respectivamente. Estos valores son muy similares a los obtenidos para el dominio C2 α silvestre en ausencia de Ca $^{2+}$ (línea punteada) confirmando, una vez más, la necesidad de la presencia de calcio para que tenga lugar una mejor interacción del dominio C2 con el PtdIns(4,5)P $_2$ (Figura III.6).

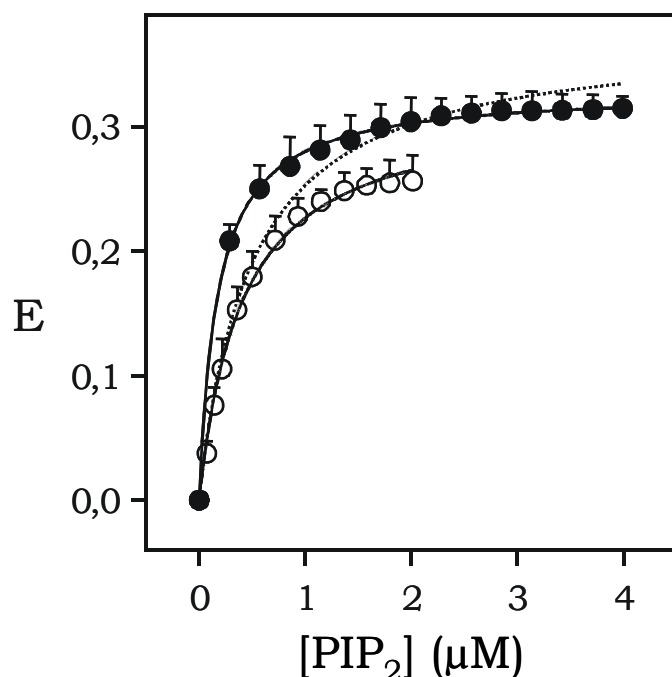


Figura III.6. Efecto de la sustitución de varios aminoácidos de la *región de unión de calcio* en la afinidad de unión a PtdIns(4,5)P $_2$ en presencia (○) y ausencia de Ca $^{2+}$ (●). Se llevaron a cabo las valoraciones con SUV de POPC/PtdIns(4,5)P $_2$ /d-PE (90:5:5) y se titularon en una disolución compuesta por: Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM que contenía el dominio C2 α -D246N/D248N (8 μ M) en ausencia (●) y presencia de Ca $^{2+}$ saturante (100 μ M) (○) a 25 °C. Con el fin de comparar los datos, la línea punteada representa los resultados de unión del dominio C2 α silvestre en ausencia de Ca $^{2+}$ y realizados bajo las mismas condiciones experimentales. La unión de SUV al dominio C2 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, reflejan los mejores ajustes de los datos a la ecuación de Hill.

3.2.2. Afinidad del unión del dominio C2 de la PKC α a otros fosfoinosítidos distintos del PtdIns(4,5)P $_2$.

De nuevo, se utilizó la técnica de FRET para determinar la especificidad del dominio C2 por diferentes tipos de fosfoinosítidos. Para ello, se añadieron distintos fosfoinosítidos a una solución que contenía el dominio C2 α silvestre y en presencia de una concentración saturante de Ca $^{2+}$ (100 μ M). Los cuatro fosfoinosítidos utilizados fueron: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P $_3$),

fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato (PtdIns(3,5)P₂), fosfatilinositol-3-fosfato (PtdIns(3)P) y fosfatidilinositol (PtdIns). La relación molar de la mezcla POPC/fosfoinosítido/d-PE fue 90:5:5.

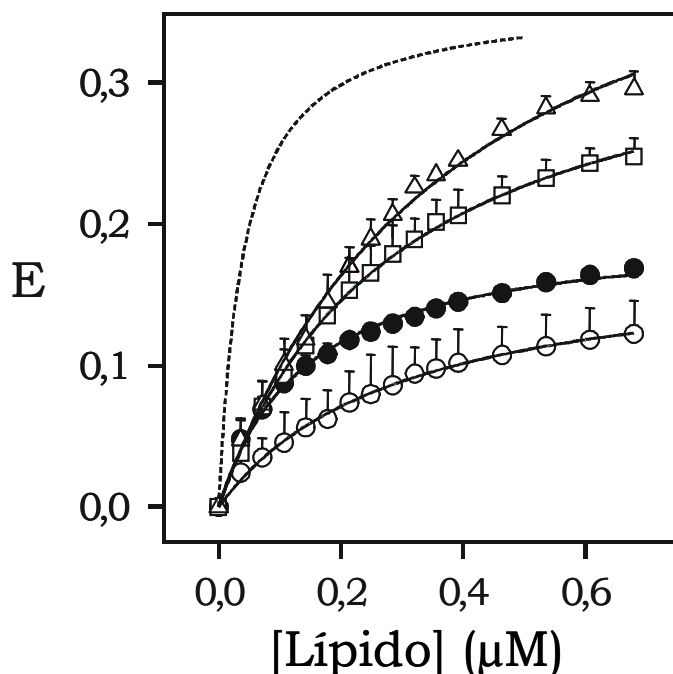


Figura III.7. El dominio C2 de la PKC α se une con mayor afinidad a PtdIns(4,5)P₂ que a otros fosfoinosítidos. Se llevaron a cabo las valoraciones con SUV de POPC/fosfoinosítido/dPE (relación molar 90:5:5) en una disolución con el dominio C2 de la PKC α (8 μ M) en un tampón compuesto por: Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM, a 25 °C y en presencia de Ca²⁺ saturante (100 μ M). Los fosfoinosítidos estudiados fueron: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) (Δ), fosfatidilinositol-3,5-bisfosfato (PtdIns(3,5)P₂) (\square), fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns(3)P) (\bullet) y fosfatidilinositol (PtdIns) (\circ). Con fines comparativos, aparece representada en línea de puntos los resultados obtenidos para la unión del PtdIns(4,5)P₂ realizadas bajo las mismas condiciones experimentales. 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 m 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, reflejan los mejores ajustes de los datos a la ecuación de Hill.

Tal y como se muestra en la [Figura III.7](#), el dominio C2 de la PKC α interaccionó con el PtdIns(3,4,5)P₃ del mismo modo que el PtdIns(4,5)P₂ siendo la afinidad para el primero mucho más baja K_D : 0,155 \pm 0,08 μ M. La capacidad de unión para el resto de

fosfoinosítidos descendió en el orden siguiente: PtdIns(3,5)P $_2$ >PtdIns(3)P>PtdIns no siendo posible el cálculo de sus constantes aparentes de disociación.

Estos resultados muestran que el PtdIns(4,5)P $_2$ se acomoda mucho mejor en la *región rica en lisinas* que el resto de fosfoinosítidos utilizados. Por tanto la presencia de cargas negativas no es determinante en la interacción proteína-fosfoinosítido sino que existe una especificidad por el tipo de lípido.

3.2.3. Afinidad de unión a membranas biológicas compuestas por POPS y PtdIns(4,5)P $_2$.

En trabajos anteriores, la afinidad de unión del dominio C2 de la PKC α por vesículas que contienen POPS fue sobre 3 μ M (Kohout y col., 2002). En este estudio nos planteamos si membranas biológicas compuestas simultáneamente por POPS y PtdIns(4,5)P $_2$ podrían cooperar para aumentar la afinidad del dominio por estas membranas modelo. Una mezcla que contenía POPC/POPS/PtdIns(4,5)P $_2$ /d-PE (56:34:5:5) se preparó para formar SUV y se titularon en una solución que contenía el dominio C2 de la PKC α en concentraciones saturantes de Ca $^{2+}$ (100 μ M).

En la [Figura III.8.](#) se muestran los resultados obtenidos y, sorprendentemente, el valor de la constante aparente de disociación fue K_D : 50 \pm 1,8 nM, valor muy similar al obtenido en vesículas que contenían sólo 5 mol% de PtdIns(4,5)P $_2$ en ausencia de POPS y 60 veces más elevada que la afinidad calculada para la unión a POPS (K_D = 3 μ M) (Kohout y col., 2002). Estos resultados revelan que la presencia de PtdIns(4,5)P $_2$ en membranas que contienen POPS aumenta de una manera relevante la afinidad de unión del dominio C2 exhibiendo una mayor afinidad por unirse a PtdIns(4,5)P $_2$ que a POPS. Asimismo, el efecto en los mutantes de la *región rica en lisinas* produjo un descenso en la afinidad de unión a estas vesículas ya que la región de unión al PtdIns(4,5)P $_2$ se encuentra afectada, descenso que no fue total debido a que la *región de unión de calcio* se encuentra intacta y por tanto es capaz de interactuar con POPS y Ca $^{2+}$. Del mismo modo, el mutante de la *región de unión de calcio* presentó un comportamiento similar, de manera que esta vez lo que ocurre es que sí se une PtdIns(4,5)P $_2$ aunque con menor afinidad debida a que la *región de unión de calcio* se encuentra afectada. Por tanto, la alteración de una zona u otra, impide que se alcance el máximo de

unión en comparación con el dominio silvestre lo que significa que ambas regiones son importantes en la funcionalidad y localización del dominio en la membrana (Figura III.8).

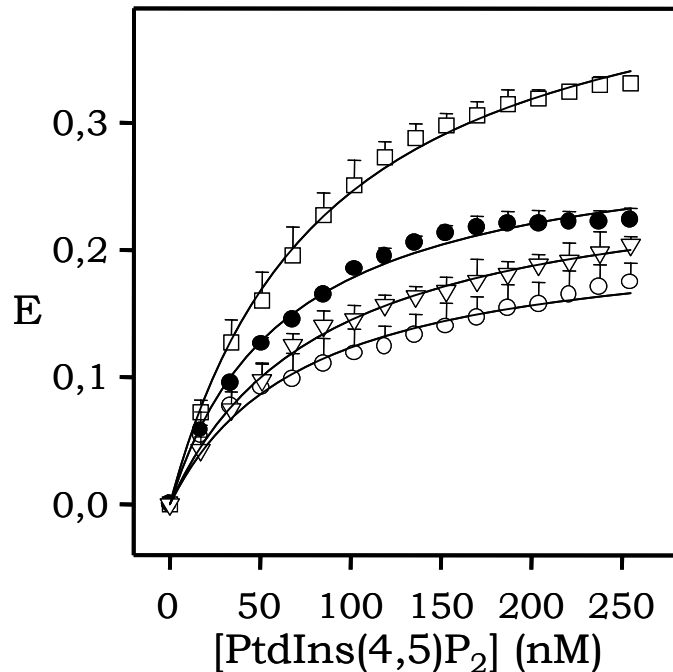


Figura III.8. Afinidad de unión del dominio C2 α -silvestre y los distintos mutantes a vesículas compuestas por POPS y PtdIns(4,5)P₂. Se llevaron a cabo las valoraciones con SUV de POPC/POPS/PtdIns(4,5)P₂/d-PE (56:34:5:5) y se titularon en una disolución compuesta por: Hepes 25 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM que contenía bien el dominio C2 de la PKC α silvestre (8 μ M) (\square) o los distintos mutantes: C2 α -K197A/K199A (\bullet) y C2 α -K209A/K211A (\circ) de la *región rica en lisinas* o C2 α -D246N/D248N (∇) de la *región de unión de calcio*. El experimento se realizó en presencia de Ca²⁺ saturante (100 μ M) y a 25 °C. La unión de SUV al dominio C2 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, reflejan los mejores ajustes de los datos a la ecuación de Hill.

4. DISCUSIÓN.

En este estudio, hemos caracterizado los determinantes moleculares que demuestran que el PtdIns(4,5)P $_2$ es capaz, por sí mismo, de unirse a la *región rica en lisinas* presente en el dominio C2 de la PKC α de un modo dependiente de Ca $^{2+}$. Estos resultados nos permiten proponer un nuevo modelo de activación para la PKC α en el cual este fosfoinosítido polifosfato juega un papel muy importante en la localización de la proteína en la membrana plasmática.

4.1. EL DOMINIO C2 DE LA PKC α SE UNE CON MAYOR AFINIDAD A PtdIns(4,5)P $_2$ EN PRESENCIA DE Ca $^{2+}$.

Un hallazgo importante obtenido en este estudio es la necesidad de la presencia de Ca $^{2+}$ para que la región polibásica del dominio C2 se una al PtdIns(4,5)P $_2$ (Figuras III.1 y III.4). Esto es muy relevante ya que la *región de unión de calcio* se encuentra bastante distante de la *región rica en lisinas*, en concreto se encuentra en los bucles presentes en la parte superior del dominio y que median la unión de POPS dependiente de Ca $^{2+}$ en este mismo dominio. Esto estaría en concordancia con la vía en la cual la PKC responde a un estímulo extracelular ya que necesita de un aumento de Ca $^{2+}$ intracitosólico que conlleva a su anclaje a la membrana y con ello a ejercer su actividad fosfotransferasa (Nishizuka, 1995; Newton, 2001; Corbalán-García y col., 2006).

Los resultados obtenidos claramente demuestran cómo la unión de Ca $^{2+}$ influye en la interacción del dominio C2 al PtdIns(4,5)P $_2$.

4.2. LA REGIÓN DE UNIÓN DE CALCIO Y LA REGIÓN RICA EN LISINAS COOPERAN EN LA UNIÓN DEL DOMINIO C2 DE LA PKC α A PtdIns(4,5)P $_2$.

Es importante destacar que la *región de unión de calcio* contiene cargas electrostáticas negativas debido a una región rica en residuos de aspártico que se convierte en positiva cuando se une el Ca $^{2+}$ (Murray y Honig, 2002). Este hecho permite que el dominio adopte una conformación óptima para interaccionar con la membrana aniónica a través de su *región rica en lisinas*. Los resultados obtenidos con los mutantes demuestran que los residuos

de Asp neutralizados de la *región de unión de calcio* apoyan esta teoría, ya que en los ensayos utilizados para medir la unión de Ca^{2+} , se encontró que una molécula de fosfoinosítido es capaz de unirse al dominio aunque con una afinidad mucho más baja (Figuras III.2 y III.6). Sin embargo, la clave para resolver esta incógnita estriba en la observación de que la sustitución de tan solo dos residuos de lisina por alanina en la *región rica en lisinas* perjudica completamente al complejo C2-PtdIns(4,5) P_2 , incluso en presencia de Ca^{2+} (Figura III.3). Además, la sustitución de los aminoácidos en esta región polibásica no afectan en modo alguno al proceso de unión de Ca^{2+} (Figura III.4 y Tabla III.2). Con ello, se deduce que tan sólo existe una sola posibilidad de acomodamiento del dominio que consiste en que el Ca^{2+} se sitúa por sí mismo en la *región de unión de calcio* facilitando además el acceso del PtdIns(4,5) P_2 a la *región rica en lisinas*.

Este modelo implicaría que el dominio puede unir POPS y PtdIns(4,5) P_2 de una forma simultánea. McLaughlin y col. (2005) han pronosticado los potenciales electrostáticos producidos por mezclas POPC/POPS las cuales exhiben una sola carga negativa neta homogénea. En contraste, el PtdIns(4,5) P_2 está altamente cargado ($z=-4$) y forma protuberancias en la membrana de modo que no se encuentra distribuido homogéneamente como la POPS (McLaughlin y Murray, 2005; Gambhir y col., 2004). Hemos intentado simular el modo de acomodamiento del dominio C2 de la PKC α a la membrana utilizando la estructura 3D de este dominio formando un complejo con POPS y Ca^{2+} . (Verdaguer y col., 1999). Además, hemos utilizado como modelo una molécula de PtdIns(4,5) P_2 que se ha colocado en la *región rica en lisinas* basándonos en el modo de interacción de otras proteínas que se unen a PtdIns(4,5) P_2 (Ford y col., 2001; Corbalán-García y col., 2003a). La Figura III.9. muestra el modelo de unión del dominio C2 a una membrana compuesta por POPC incluyendo POPS y PtdIns(4,5) P_2 . Se observa cómo el dominio se ancla a la membrana en una orientación que es consistente con muchos resultados experimentales obtenidos con membranas modelo y cultivos celulares, incluyendo los realizados en este trabajo (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002; Bolsover y col., 2003; Kohout y col., 2003), apoyando además la hipótesis de una doble interacción del dominio C2 con Ca^{2+} /fosfatidilserina y PtdIns(4,5) P_2 a través de la *región de unión de calcio* y la *región rica en lisinas* respectivamente (Marín-Vicente y col., 2005; Sánchez-Bautista y col., 2006).

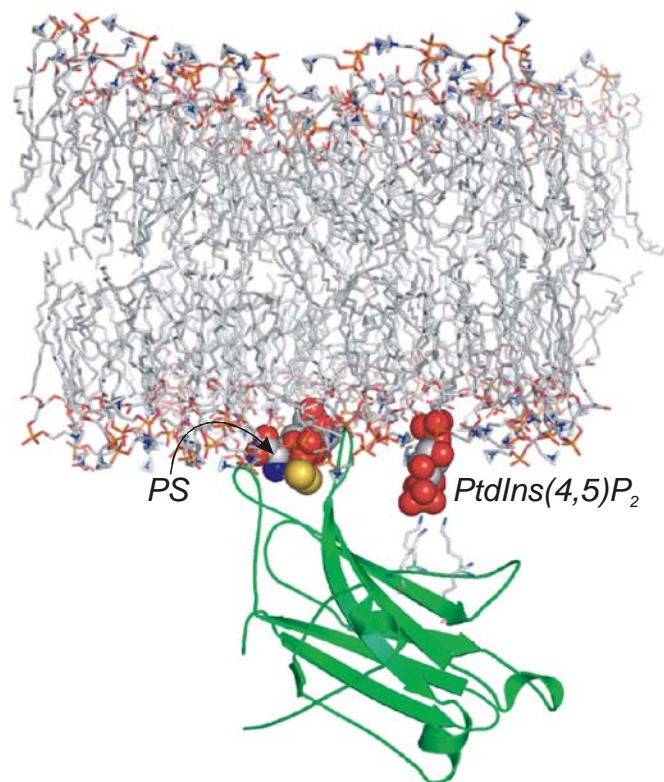


Figura III.9. Representación esquemática del modelo de unión del dominio C2 de la PKC α a la membrana. Se corresponde a una membrana modelo compuesta por POPC en formato PDB (código: popc128a) (Hoff y col., 2005). La mitad de la bicapa aparece en modelo de barras con los átomos de carbono en gris, los de nitrógeno en azul y los de oxígeno en rojo. La estructura general del dominio C2 de la PKC α aparece representada como modelo de cintas con las hojas β en verde (tomada del programa PDB, código: 1DSY). Los cuatro residuos de lisina localizados en la *región rica en lisinas* se presentan en modelo de barras con los átomos de carbono en gris y los de nitrógeno en azul. Las cabezas polares de los fosfolípidos de unión, fosfatidilserina (POPS) y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P $_2$) (representados como esferas), permiten encajar el dominio en la región hidrofílica de la membrana. Los iones Ca $^{2+}$ aparecen representados como esferas amarillas. Es de destacar que nuestro modelo se ajusta bien a una sola molécula del dominio C2 capaz de unir una molécula de POPS a través de la *región de unión de calcio* y una molécula de PtdIns(4,5)P $_2$ a través de la *región rica en lisinas*. Esta representación estructural se realizó utilizando el programa WebLab Viewer Pro, Accelrys, Inc.

4.3. EL DOMINIO C2 DE LA PKC α PRESENTA MAYOR AFINIDAD POR PtdIns(4,5)P $_2$ QUE POR OTROS FOSFOLÍPIDOS NEGATIVOS.

Los resultados obtenidos arrojan luz en un tema tan importante como es conocer la naturaleza de la interacción del dominio C2 al PtdIns(4,5)P $_2$. En este caso, se ha demostrado que el modo de interacción del PtdIns(4,5)P $_2$ implica un componente

específico más que un mero secuestro electrostático. Hemos proporcionado dos evidencias muy importantes para esto: (i) una reside en la particularidad de que el fosfoinosítido solamente se une a la *región rica en lisinas* y no a la *región de unión de calcio*, aunque ambos motivos sean potencialmente iguales para interaccionar con fosfolípidos de carácter ácido, mientras que la otra evidencia (ii) consiste en la alta especificidad que presenta la *región rica en lisinas* para unir PtdIns(4,5)P₂ con respecto al resto de fosfoinosítidos también altamente cargados como PtdIns(3,4,5)P₃ o PtdIns(3,5)P₂ (Figura III.6). Este hecho, junto con la premisa de que el PtdIns(4,5)P₂ se encuentra en la membrana plasmática a concentraciones más elevadas que en otros compartimentos subcelulares y en mayor proporción que otros fosfoinosítidos doble o triplemente fosforilados (Vanhaesebroeck y col., 2001) harían que aumente la posibilidad de que la PKC α interaccione con el PtdIns(4,5)P₂ en la membrana celular.

Es de destacar que en presencia de Ca²⁺, el dominio C2 de la PKC α muestra una afinidad 10 veces más elevada por PtdIns(4,5)P₂ ($K_D=1,85 \mu\text{M}$) (Figura III.1) que por fosfatidilserina ($K_D=18 \mu\text{M}$) (Torrecillas y col., 2004) en medidas realizadas mediante ITC o bien una afinidad 60 veces más alta cuando las medidas se realizaron mediante FRET (Figura III.8), lo que refuerza la idea de que el dominio C2 se une al PtdIns(4,5)P₂ con un alto grado de especificidad. Además, la afinidad del dominio C2 es muy similar a la que presentan otros dominios que también interaccionan con el PtdIns(4,5)P₂ como es el caso del dominio PH de la PLC δ (presenta una constante de $1.66 \mu\text{M}$, medida realizada en ITC) (Lemmon y col., 1995).

Asimismo, hemos demostrado que el PtdIns(4,5)P₂ es capaz de provocar la localización de la PKC α en la membrana (Sánchez-Bautista y col., 2006). Experimentos realizados en células RBL-2H3 proporcionan importantes evidencias de que los mecanismos de activación de la PKC α implican un paso crítico en el cual es necesaria la interacción directa del PtdIns(4,5)P₂ a través de la *región rica en lisinas*. Teniendo en cuenta que las mutaciones en este sitio no afectan a las propiedades de unión del dominio a Ca²⁺, estos resultados sugieren firmemente que la localización de la PKC α es debida a la interacción entre el dominio C2 y el PtdIns(4,5)P₂. En esta situación, cabría esperar al menos una localización transitoria debida

a la unión de Ca²⁺/fosfatidilserina, pero debido a que la afinidad por PtdIns(4,5)P₂ es más elevada que por fosfatidilserina (60 veces) (Figura III.8), este efecto sólo podría superarse si se dan unas concentraciones de Ca²⁺ más elevadas en el citosol, por ejemplo, en este caso cuando se añade ionomicina para producir un flujo de Ca²⁺ (Sánchez-Bautista y col., 2006).

Varios estudios han demostrado que existen otras proteínas que contienen dominios C2 y que son también capaces de unirse a PtdIns(4,5)P₂. Así, el dominio C2 de signaptotagmina I también es capaz de unirse a PtdIns(4,5)P₂ en función del Ca²⁺ (Zhang y col., 1998; Bai y col., 2004), y que la presencia de PtdIns(4,5)P₂ aumenta la afinidad aparente del Ca²⁺ de estos dominios por vesículas de fosfolípidos (Li y col., 2006). Esto también ha sido demostrado previamente en el dominio C2 de la PKC α (Evans y col., 2006) y, en base a estos resultados y los obtenidos aquí, se puede concluir que se produce un mecanismo secuencial que conduce a la interacción PtdIns(4,5)P₂-PKC α ya que, en ausencia de Ca²⁺, la afinidad por esta molécula desciende enormemente (Figura III.1B). Del mismo modo, existen proteínas que aunque no contienen dominios C2 poseen una región rica en residuos básicos que son los responsables de la localización de la proteína en la membrana. Estas proteínas, como KRas4B y otras GTPasas, son capaces de anclarse a la membrana a través de su unión a PtdIns(4,5)P₂ y PtdIns(3,4,5)P₃ (Heo y col., 2006). En este sentido, hemos demostrado que después del PtdIns(4,5)P₂, el PtdIns(3,4,5)P₃ es el segundo fosfoinosítido al que se une el dominio C2 de la PKC α con mayor afinidad (Figura III.7).

Un trabajo previo en nuestro laboratorio ha demostrado que el PtdIns(4,5)P₂ produce un aumento de 5 veces en la actividad catalítica de la PKC α comparada con concentraciones similares de fosfatidilserina (Corbalán-García, y col., 2003), sugiriendo que el fosfoinosítido no está solamente implicado en la localización de la proteína sino también en su activación. El hecho de que el PtdIns(4,5)P₂ por sí mismo pueda inducir la localización y activación específica de la enzima plantea una cuestión crítica sobre cómo combinar el modelo de activación clásico de esta familia de enzimas, en el cual el PtdIns(4,5)P₂ se hidroliza para generar diacilglicerol e Ins(3,4,5)P₃ necesarios para activar a la PKC, con el mecanismo aquí propuesto. Se ha demostrado que existe una parte de PtdIns(4,5)P₂ en la membrana plasmática que se hidroliza mientras que la otra

permanece intacta y por tanto disponible para interactuar con la PKC α (Koreh y Monaco, 1986; Wang y col., 2004; Sánchez-Bautista y col., 2006). Esto implica que los nuevos datos obtenidos en este trabajo no invalidan el modelo clásico propuesto ya que se ha demostrado que los tres ligandos, Ca²⁺, diacilglicerol y PtdIns(4,5)P₂ son esenciales para la activación y localización de la PKC α en la membrana. En cambio, estos resultados aumentan nuestro conocimiento en lo que concierne al mecanismo de activación de esta familia de isoenzimas, y proporcionan información muy relevante sobre cómo la PKC α se une específicamente a la membrana en lugares donde pueda acceder a sus sustratos. Un ejemplo de esto se encuentra en los sustratos principales de la PKC p.e. sustrato de quinasa-C rica en alanina miristoilada (MARCKS) y proteína asociada al crecimiento 43 (GAP43), los cuales se sabe que regulan los niveles de PtdIns(4,5)P₂ en ciertas áreas de la membrana plasmática (Golub y Pico, 2005; McLaughlin y col., 2005).

Es importante mencionar la naturaleza multifuncional del dominio C2 de la PKC α , ya que no todos los segundos mensajeros generados en la membrana plasmática actúan en la misma vía de activación de la enzima. Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el ácido araquidónico y el ácido todo-*trans*-retinoico son capaces de activar a la enzima actuando solamente a través de la *región de unión de calcio* (López-Andreo y col., 2005; López-Nicolás y col., 2006), mientras que la activación de los receptores P2X en células dPC12 (Marín-Vicente y col., 2005) o los receptores IgE en células RBL-2H3 necesitan ambas regiones del dominio C2, la *región de unión de calcio* y la *región rica en lisinas*, para producir la activación de la PKC α (Sánchez-Bautista y col., 2006).

1. RESUMEN.

El dominio C2 de la PKC ϵ (C2 ϵ), perteneciente a la subfamilia de las PKC nuevas (PKCn), se une a lípidos negativos en ausencia de Ca²⁺. En este trabajo, hemos estudiado mediante las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) el modo en el cual los lípidos fosfatidilcolina (POPC) y ácido fosfatídico (POPA) de membranas modelo se alteran, en conformación y organización, por la interacción con el dominio C2 de la PKC ϵ .

Los resultados de DSC confirman que el dominio C2 ϵ es capaz de modificar la temperatura de transición del POPA de la fase gel a la fase líquido-cristalina, donde además de producir un aumento de la temperatura de inicio de la transición (T_c) de 16 °C a 19,6 °C, se produce un ensanchamiento en dicha transición de 1,4 °C a 2,5 °C. La utilización de mezclas lipídicas de POPC/POPA a diferentes relaciones molares produjeron ligeros cambios en los diferentes parámetros termodinámicos y en ningún caso se observó separación de fases.

También se realizaron experimentos de resonancia magnética nuclear por rotación a alta velocidad en el ángulo mágico (RMN-MAS) donde se demostró que el dominio C2 ϵ afecta específicamente al POPA. Esto se observó en un descenso a bajo campo del pico isotrópico de POPA, en el ensanchamiento del pico y en el descenso de valores de T_1 y T_2 a todas las temperaturas estudiadas. Estos efectos fueron mucho más notables con respecto a los que se observaron con POPC 100%, indicando así la especificidad del dominio C2 ϵ por lípidos de carácter ácido como el POPA. Por último, se demostró mediante experimentos de espectroscopía de infrarrojo que la presencia del dominio C2 de la PKC ϵ provoca un cambio en la conformación de la cabeza polar del POPA.

Todos estos resultados nos indican claramente la interacción de tipo electrostático que tiene lugar entre el dominio C2 de la PKC ϵ y membranas que contienen POPA de un modo independiente de Ca²⁺.

2. INTRODUCCIÓN.

La isoenzima PKC ϵ pertenece a la subfamilia de las PKC nuevas y está implicada en multitud de funciones celulares que incluyen la diferenciación neuronal (Brodie y col., 1999; Zeidman y col., 1999), la resistencia antiviral (Pfeffer y col., 1991), la secreción hormonal (Akita y col., 1994), la regulación de transportadores (Lehel y col., 1994; Liedtke y col., 2002) y la señalización dependiente de integrinas (Ivaska y col., 2002; Ivaska y col., 2003), entre otras. Además, en sistemas celulares parece desempeñar un papel muy importante en la regulación de la supervivencia y de la apoptosis celular. Así, parece ser que en células MCF-7 impide la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral TNF α (Basu y col., 2002). Por el contrario, en otros sistemas celulares la PKC ϵ parece mediar la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo (Jung y col., 2004) y la apoptosis de macrófagos en respuesta a lipopolisacáridos vía activación de la quinasa amino terminal *c-Jun* (JNK) (Comalada y col., 2003).

La PKC ϵ también juega un papel muy importante en la protección de los cardiomiocitos en las fases tempranas de preacondicionamiento isquémico del corazón (Liu y col., 1999; Cross y col., 2002). Todo ello junto con que la PKC ϵ muestra un efecto cardioprotector en ratones diabéticos (Malhotra y col., 2005) hacen que esta proteína sea una importante diana para la terapia de distintas enfermedades. De hecho, se sabe que es posible obtener cardioprotección en un proceso de isquemia mediante continua liberación del péptido activador de la PKC ϵ (Inagaki y col., 2005).

En cuanto a la estructura, las PKCn poseen en la región amino terminal la región reguladora que consta del dominio C1 encargado de unir diacilglicerol o ésteres de forbol y del dominio C2 responsable de la unión a lípidos aniónicos de un modo independiente de Ca²⁺. Las PKC se unen a la membrana a través de interacciones de tipo electrostático, esto ocurre por el reconocimiento específico de fosfolípidos con carga negativa como la fosfatidilserina (POPS) y el ácido fosfático (POPA) (Corbalán-García y col., 1999; Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). Sin embargo, se sabe que los fosfolípidos zwitteriónicos como la fosfatidilcolina (POPC), no son tan propicios para que tengan lugar las interacciones electrostáticas entre las proteínas periféricas cargadas y la membrana (Hernández-Caselles y col., 1993). Estudios estructurales han demostrado que el

dominio C2 de las PKC clásicas tales como la PKC α muestra dos áreas en la parte superior de la molécula que participa en la unión a membranas de naturaleza aniónica (Corbalán-García y col., 1999; Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). Experimentos *in vitro* han confirmado la capacidad tanto del dominio C2 ϵ como de la PKC ϵ completa de unirse a vesículas compuestas por fosfolípidos cargados negativamente de un modo independiente de Ca $^{2+}$ (Medkova y Cho, 1998; García-García y col., 2001; Ochoa y col., 2001, Corbalán-García y col., 2003b; Stahelin y col., 2005). Además, este dominio regulador presenta una notable preferencia por el ácido fosfatídico (Ochoa y col., 2001; Corbalán-García y col., 2003b) ya que incluso en experimentos *in vivo* se ha demostrado que la PKC ϵ se une a POPA a través del dominio C2 (López-Andreo y col., 2003). Es de destacar que aunque el POPA tiene tan sólo un grupo polar, se trata de un lípido muy activo que es reconocido específicamente por multitud de proteínas (Testerink y Munnik, 2005).

Estudios recientes *in vivo* revelan la importancia del POPA en la localización de la PKC ϵ en la membrana plasmática a través del dominio C2, esto sugiere que el POPA es un activador muy importante de la PKC ϵ . La enzima, una vez anclada a la membrana, parece estar implicada en la vía de señalización celular desencadenada por la fosfolipasa D (López-Andreo y col., 2003).

En este capítulo hemos utilizado la técnica de resonancia magnética nuclear de ángulo mágico (RMN-MAS) ya que proporciona espectros de alta resolución, siendo una técnica muy útil para estudiar membranas compuestas por vesículas grandes (Oldfield y col., 1987; Hamilton y col., 1991) sin la necesidad de utilizar vesículas sonicadas y por tanto, nos permite utilizar membranas modelo similares a las propias biomembranas. En concreto, la técnica ^{31}P -RMN MAS permite la observación a alta resolución del grupo fosfato de los fosfolípidos y por tanto se pueden resolver los distintos fosfolípidos presentes en vesículas multilamelares (Pinheiro y Watts, 1994b), se pueden determinar los cambios en cuanto a desplazamiento químico de los picos isotrópicos y también se pueden resolver las perturbaciones en los tiempos de relajación debidos a la presencia de proteína (Pinheiro y Watts, 1994b; Carbone y Macdonald, 1996; Bonev y col., 2001; Bonev y col., 2003; Lindström y col., 2005). También se ha utilizado la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para demostrar que la proteína es capaz

de afectar a la membrana sin llegar a producir una separación de fases. Finalmente, la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) nos permitió estudiar la interacción de la proteína con la interfase lípido-agua. Con esta combinación de técnicas hemos demostrado que la presencia de la proteína es capaz de modificar la conformación del grupo polar de los fosfolípidos.

3. RESULTADOS.

3.1. EFECTO DEL DOMINIO C2 de la PKC ϵ EN LA TEMPERATURA DE TRANSICIÓN DE DIFERENTES MEZCLAS LIPÍDICAS.

Se utilizó la calorimetría diferencial de barrido (DSC) para estudiar el estado físico del ácido fosfatídico (POPA 100%) así como de diferentes mezclas de POPA y fosfatidilcolina (POPC) con el fin de analizar el efecto que producía en éstas la presencia del dominio C2 de la PKC ϵ .

Las mezclas lipídicas analizadas estaban constituidas por POPA (100%) o bien por POPC/POPA a diferentes relaciones molares (1:2 y 1:1).

La [Figura IV.1](#) muestra los termogramas recogidos de las muestras analizadas bien en ausencia o presencia del dominio C2 de la PKC ϵ . En ausencia de proteína, la muestra que contenía POPA (100%) presentó una temperatura de comienzo en la transición $T_c = 16$ °C mientras que la adición del dominio C2 ϵ produjo un aumento de la misma siendo $T_c = 19,6$ °C ([Figura IV.1](#) y [Tabla IV.1](#)). Del mismo modo, la presencia de proteína produjo un descenso en el valor de entalpía de transición (ΔH) de 7,6 a 4,6 kcal/mol y un aumento en la anchura del pico de transición a media altura ($T_{1/2}$) de 1,4 °C a 2,5 °C ([Tabla IV.1](#)).

Asimismo, se realizaron experimentos con mezclas fosfolipídicas que incluían POPC y POPA a diferentes relaciones molares (1:2 o 1:1) en ausencia y presencia del dominio C2 ϵ . Cuando se añadió la proteína, los valores de ΔH , T_c , T_m y $T_{1/2}$ variaron en menor medida que para el caso de la muestra de POPA y en ningún caso se observó separación de fases entre los lípidos POPC y POPA debida a la adición del dominio C2 ϵ ([Tabla IV.2](#)).

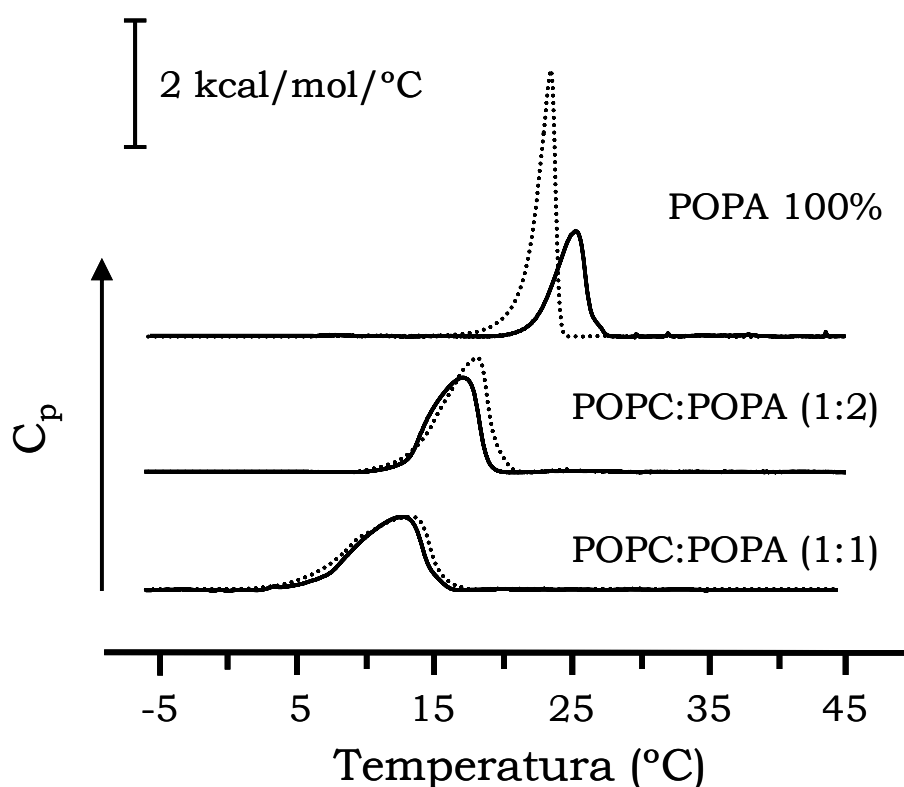


Figura IV.1. Termograma de los calentamientos del POPA 100% o de la mezcla POPC/POPA. Se prepararon vesículas multilamelares con POPA 100% o con POPC/POPA a unas relaciones molares de 1:2 y 1:1 en ausencia (línea continua) o presencia del dominio C2 de la PKC ϵ (línea discontinua). Se prepararon vesículas multilamelares con $\sim 1,3$ μ moles de lípido en ausencia o presencia de C2 ϵ (0,032 μ moles) siendo la relación molar lípido/proteína 40:1. El tampón utilizado contenía: Hepes 25 mM (pH 7,4), KCl 10 mM y EDTA 0,1 mM. Los termogramas se recogieron en un calorímetro VP-DSC (Valery Plotnikov Differential Scanning Calorimeter) usando como referencia el mismo tampón de resuspensión. Las muestras se analizaron en un rango de temperaturas entre -5 °C y 45 °C con una velocidad de calentamiento de 1° C/min. Los barridos se repitieron hasta obtener perfiles idénticos. Se muestra el cuarto barrido de calentamiento de cada muestra. Las proporciones molares utilizadas en cada caso se muestran a la derecha de cada termograma.

Es de destacar que la relación molar lípido/proteína fue de 40:1, esto indica una molécula de dominio C2 ϵ podría interaccionar a la vez con varias moléculas de fosfolípido. Por tanto el dominio C2 ϵ interacciona con mayor afinidad con POPA mientras que la presencia de POPC produce un descenso en la temperatura de transición sin llegar a producir, en ningún caso, separación de fases.

Tabla IV.1. Se muestran los diferentes valores termodinámicos^a de diferentes mezclas de fosfolípidos, a las relaciones molares indicadas, tanto en ausencia como en presencia del dominio C2 de la PKC ϵ .

Parámetros	POPA	POPA+ C2 ϵ	PC/PA (1:2)	PC/PA (1:2)+ C2 ϵ	PC/PA (1:1)	PC/PA (1:1)+ C2 ϵ
ΔH (kcal/mol)	7,6	4,6	7,7	6,0	7,7	6,7
T_c (° C)	16,0	19,6	9,1	10,3	0,8	2,5
T_m (° C)	23,5	25,3	18,1	17,1	13,3	12,7
$T_{1/2}$ (° C)	1,4	2,5	3,8	4,0	6,4	5,5

ΔH : entalpía de transición, T_c : temperatura de comienzo de la transición, T_m : temperatura con la transición completada al 50% y $T_{1/2}$: valores de la anchura a media altura del pico de transición.

3.2. ESPECTROSCOPIA DE ^{31}P -RMN MAS.

Debido a que con los estudios preliminares mediante DSC habían demostrado que la presencia del dominio C2 ϵ produce cambios en las variables termodinámicas de los fosfolípidos denotando la existencia de interacción entre el dominio C2 ϵ y POPA. Se utilizó la técnica de resonancia magnética nuclear de ángulo mágico, ^{31}P -RMN MAS, para obtener información sobre la interacción que tiene lugar entre el dominio C2 ϵ y los fosfolípidos presentes en membranas modelo. Los resultados podrían proporcionar información general acerca del tipo de interacción y además, ya que los picos de POPC así como de POPA se pueden resolver diferencialmente, podríamos obtener información específica de cada uno de ellos. Así, la técnica de ^{31}P -RMN MAS podría proporcionar información sobre el ambiente electrostático local para cada especie de lípido presente en la membrana.

3.2.1. ^{31}P -RMN MAS del POPA en ausencia o presencia de C2 ϵ .

La Figura IV.2. muestra los espectros ^{31}P -RMN MAS de la mezcla de POPA 100% en presencia y ausencia del dominio C2 ϵ a 30 °C. Para el caso de la muestra de POPA 100% se observó un perfil estrecho con un valor desplazamiento químico (d.q.) de 1,21 ppm y un valor de anchura a media altura de 0,13 ppm (Figura IV.2A). Sin embargo, la presencia del dominio C2 ϵ (relación molar lípido/proteína 40:1) produjo un perfil similar pero con un d.q. de 1,91 ppm y una

anchura a media altura de 0,40 ppm (**Figura IV.2B**). Este desplazamiento químico a bajo campo del pico isotrópico del POPA se relaciona claramente con la interacción de la proteína con el lípido. Así, se observaron cambios similares en el desplazamiento químico del espectro ^{31}P -RMN debido a la interacción de la cardiotoxina II a fosfatidilglicerol (POPG), estos cambios se atribuyeron a la interacción de las cabezas polares del fosfolípido con los residuos catiónicos de la proteína, desprotegiendo así el núcleo de fósforo (Carbone y col., 1996). Se ha visto que tiene lugar un desplazamiento a bajo campo cuando el grupo fosforilo del ácido fosfático pierde un protón y acepta una segunda carga negativa (Swairjo y col., 1994; Kooijman y col., 2005). Sin embargo, en otros sistemas como el caso del péptido $\text{A}\beta_{1-40}$, los espectros de resonancia ^{31}P -RMN de los lípidos dimiristoilfosfatidilcolina y dimiristoilfosfatidilglicerol experimentaron un desplazamiento a alto campo (Bonev y col., 2001; Bokvist y col., 2004) probablemente debido a que los lípidos implicados son diferentes, en cuyo caso el cambio conformacional de la cabeza polar podría ser distinto al que tiene lugar para el ácido fosfático.

Otra consecuencia de la unión de las vesículas de POPA al dominio C2 de la PKCε es el ensanchamiento que se produce en el pico, este aumento en la anchura a media altura refleja claramente un descenso en la movilidad del fosfolípido. Así, se observó un ensanchamiento de este tipo para el caso del dimiristoilfosfatidilglicerol en presencia del péptido $\text{A}\beta_{1-40}$ y se interpretó como una restricción en la movilidad del fosfolípido (Bonev y col., 2001).

Por otro lado, también quisimos estudiar el efecto del triple mutante C2ε-W23A/R26A/R32A presente en el bucle 1 del dominio C2 y que previamente se ha demostrado que posee una capacidad reducida de unir POPA (Corbalán-García y col., 2003b). De nuevo la relación molar lípido/proteína fue 40:1. La **Figura IV.2B**. demuestra que el cambio a bajo campo en el espectro ^{31}P -RMN para el POPA fue menos pronunciado que el observado para el dominio silvestre, produciéndose un desplazamiento químico de 1,61 ppm mientras que la anchura a media altura aumentó tan sólo 0,33 ppm (**Tabla IV.2**). Esto significa que la eliminación de los residuos con carga positiva impide la interacción de tipo electrostático con los lípidos negativos como el POPA.

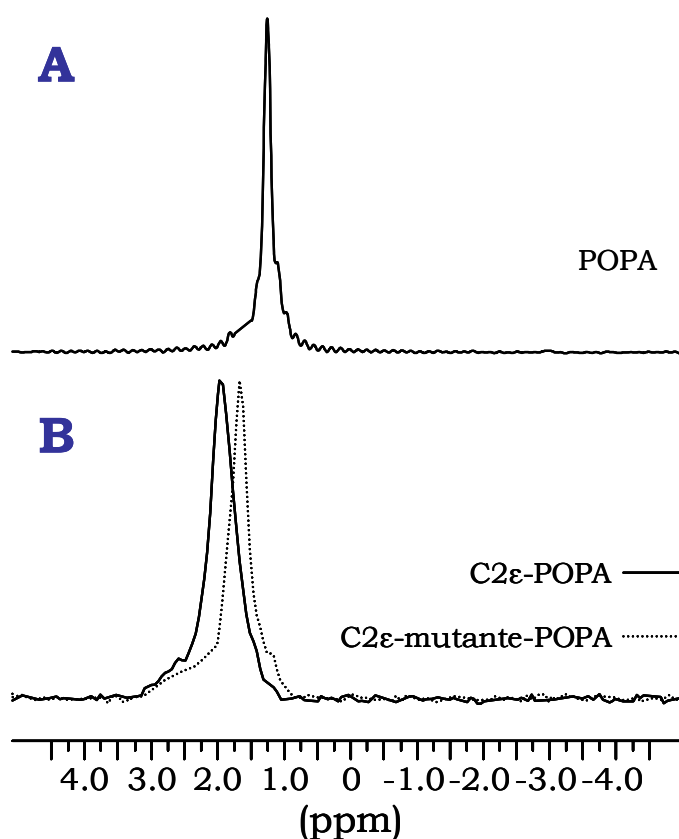


Figura IV.2. Espectros de ^{31}P -RMN MAS del POPA en ausencia (A) y presencia del dominio C2 ϵ (B). Se muestran los espectros de vesículas multilamelares compuestas por el lípido POPA en ausencia (A) o presencia del dominio C2 ϵ silvestre (línea continua) o mutante (línea de puntos) (B). El dominio mutante utilizado fue el C2 ϵ -W23A/R26A/R32A, residuos del bucle 1 del dominio C2 ϵ e implicados en la unión a fosfolípidos de naturaleza negativa. Estas vesículas se resuspendieron en un tampón compuesto por: HEPES 25 mM (pH 7,4), KCl 10 mM y EDTA 0,1 mM. La relación lípido/proteína utilizada fue 40:1. Los espectros se obtuvieron en un espectrómetro RMN Avance 600 (Bruker, Etlingen, Germany) que opera a una frecuencia de protón de 600.13 y 242.9 MHz para el ^{31}P . Los espectros se obtuvieron con 1352 puntos con una anchura espectral de 19380 Hz y un tiempo de adquisición de 0,034 s.

3.2.2. ^{31}P -RMN MAS de diferentes mezclas POPC/POPA en ausencia y presencia del dominio C2 ϵ .

Posteriormente se introdujo la POPC en la composición de la membrana reduciéndose así la carga en la superficie de la bicapa debido a la disminución del porcentaje de POPA. Hay que decir, que bajo las condiciones de ángulo mágico, se obtuvieron espectros de alta resolución donde se pueden observar los distintos picos de los fosfolípidos individualmente. En cualquiera de los casos estudiados, los espectros presentaron un perfil estrecho e isotrópico lo que es

indicativo de que las membranas se encontraban en un estado fluido a la temperatura estudiada (30 °C).

Tabla IV.2. Se muestran los valores de desplazamiento químico así como la anchura a media altura de los picos ^{31}P -RMN MAS de cada una de las mezclas fosfolipídicas estudiadas, a las relaciones molares indicadas, tanto en ausencia como en presencia del dominio C2 de la PKC ϵ .

	^{31}P de POPC		^{31}P de POPA	
	desplazamiento químico (ppm)	anchura a media altura (ppm)	desplazamiento químico (ppm)	anchura a media altura (ppm)
POPA			1,21	0,13
POPA+C2 ϵ			1,91	0,40
POPA+C2 ϵ mut ^a			1,61	0,33
POPC/POPA (1:2)	-0,51	0,13	0,71	0,13
POPC/POPA (1:2)+C2 ϵ	-0,40	0,13	1,32	0,40
POPC/POPA (1:1)	-0,62	0,21	0,51	0,13
POPC/POPA (1:1)+C2 ϵ	-0,41	0,32	1,21	0,40
POPC/POPA (2:1)	-0,79	0,27	0,33	0,24
POPC/POPA (2:1)+C2 ϵ	-0,86	0,27	0,61	0,40
POPC	-0,91	0,15		
POPC+C2 ϵ	-0,82	0,17		

^a El mutante C2 ϵ corresponde a C2 ϵ -W23A/R26A/R32A. Los valores correspondientes a los picos de ^{31}P de POPC y POPA se pueden observar separadamente gracias a la técnica RMN-MAS utilizada.

La **Figura IV.3.** muestra los espectros ^{31}P -RMN MAS de las distintas mezclas lipídicas de POPC/POPA a diferentes relaciones molares en presencia y ausencia de proteína. En primer lugar se prepararon vesículas multilamelares compuestas por POPC/POPA (relación molar 1:2) (**Figura IV.3A** y **Tabla IV.2**). El espectro ^{31}P -RMN resultante dio lugar a la presencia de dos picos isotrópicos claramente diferenciados debidos a POPC y a POPA, donde el tamaño relativo de los mismos reflejaron la relación molar utilizada. Así, el pico debido a la POPC se situó a -0,51 ppm y el pico debido al POPA se localizó a 0,71 ppm. Es interesante destacar que la presencia de la POPC produce que el pico de POPA experimente un cambio a alto campo en comparación con la muestra de POPA 100% (1,21 ppm). Del mismo modo, en la mezcla lipídica POPC/POPA (relación molar 1:1) (**Figura IV.3B** y **Tabla IV.2**) el pico de POPA experimentó un

cambio a alto campo de 0,51 ppm. Asimismo, se observó la misma tendencia para la muestra POPC:POPA (relación molar 2:1) con un valor de 0,33 ppm para el POPA (Figura IV.3C).

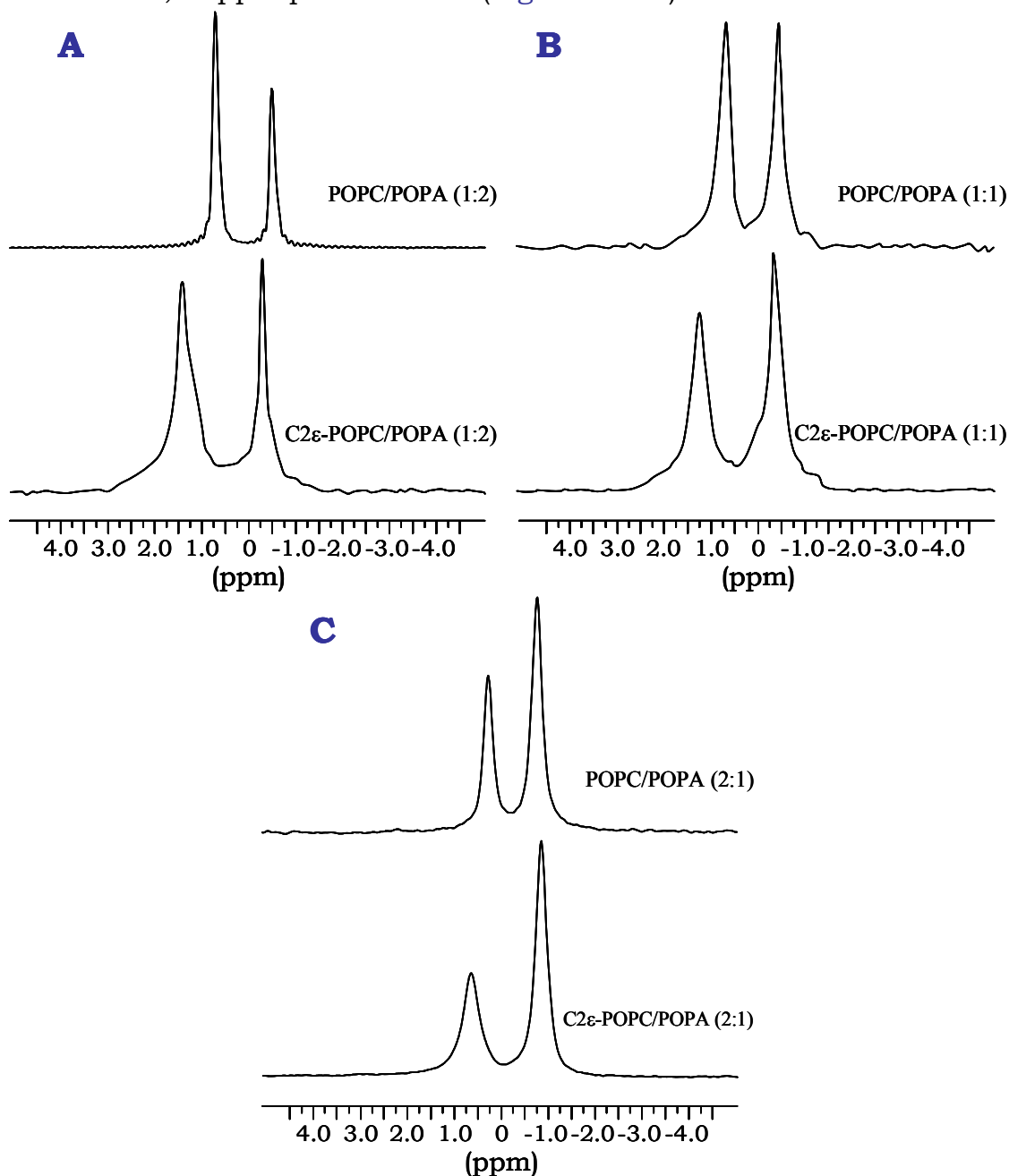


Figura IV.3. Espectros de ^{31}P -RMN MAS de diferentes mezclas de POPC/POPA en ausencia y presencia del dominio C2 ϵ (B). Se muestran los espectros de vesículas multilamelares compuestas por POPC/POPA a las relaciones molares indicadas, en ausencia o presencia del dominio C2 ϵ silvestre. Estas vesículas se resuspendieron en un tampón compuesto por: Hepes 25 mM (pH 7,4), KCl 10 mM y EDTA 0,1 mM. La relación lípido/proteína utilizada fue 40:1. Los espectros se obtuvieron de forma similar a la descrita en la Figura IV.2.

Este efecto observado por la disminución de la carga en la superficie, también se observó en mezclas de dimiristoilfosfatidilcolina/dimiristoilfosfatidilglicerol y se atribuyó al cambio en el potencial electrostático presente en la superficie de la membrana (Bonev y col., 2001; Bokvist y col., 2004). Como previamente hemos descrito, en la mezcla POPC/POPA las moléculas de POPC mantienen aislados los grupos polares cargados del POPA de modo que se reduce considerablemente la densidad de carga existente en la membrana produciendo un valor de pK_a aparente más bajo (Swairjo y col., 1994). El POPA, cuando está protonado sufre un desplazamiento químico a alto campo (Swairjo y col., 1994; Kooijman y col., 2005) debido a que la inclusión de moléculas de POPC producen un aumento de protonación del POPA. También es de destacar que el pico isotrópico de la POPC sufrió un d.q. a bajo campo quedando a -0,51 ppm cuando se incluyó el POPA en la membrana en el caso de la mezcla POPC/POPA (relación molar 1:2) (Figura IV.2B y Tabla IV.2) en comparación con la muestra de POPC 100% cuyo d.q. fue -0,91 ppm. Asimismo, en las mezclas POPC:POPA (relación molar 1:1 y 2:1) (Figuras IV.3B y IV.3C) los valores de d.q. fueron -0,62 y -0,79 ppm respectivamente (Tabla IV.2).

Sin embargo la incorporación del dominio C2 de la PKCε a estas vesículas compuestas por POPC/POPA, cuya relación lípido/proteína fue 40:1, produjo unos cambios a bajo campo en los valores de desplazamiento químico sobre todo en el pico de POPA. Así, en la mezcla POPC/POPA (relación molar 1:2) el pico ^{31}P -RMN correspondiente al POPA apareció a 1,32 ppm frente a 0,71 ppm en ausencia de proteína mientras que el pico de POPC se situó a -0,40 y -0,51 ppm en presencia y ausencia de proteína respectivamente (Figuras IV.3A y Tabla IV.2).

En el caso de la muestra POPC/POPA (relación molar 1:1), la adición de proteína produjo que el pico de POPA se localizase a 1,21 ppm mientras que en ausencia se encontraba a 0,51 ppm. Del mismo modo, el pico correspondiente a POPC se situó a -0,41 ppm frente a -0,62 en presencia y en ausencia del dominio C2ε respectivamente. (Figura IV.3B y Tabla IV.2).

Por último en la muestra POPC/POPA (2:1) y en presencia del dominio C2 de la PKCε, el pico de POPA experimentó un valor de d.q. de 0,61 ppm, frente 0,33 ppm en ausencia de proteína; mientras que

en el pico correspondiente a POPC se produjo un cambio de -0,86 ppm y -0,79 ppm en presencia y ausencia de proteína respectivamente (Figura IV.3C y Tabla IV.2).

Otro aspecto a destacar es el ensanchamiento que experimentaron los picos tras la adición del dominio C2 de la PKC ϵ afectando en mayor medida al pico de POPA. Esto remarca la interacción que tiene lugar entre el POPA y la proteína, de modo que en la mezcla POPC/POPA (relación 1:2) (Figura IV.3A) el pico correspondiente a POPA experimentó un ensanchamiento de 0,40 ppm (frente a 0,13 ppm en ausencia de proteína) mientras que el pico debido a POPC no varió su valor siendo de 0,13 ppm en ambos casos. En el caso de la muestra POPC:POPA (relación molar 1:1) ambos picos experimentaron un ensanchamiento cuyos valores fueron de 0,40 ppm y de 0,32 ppm para POPA y POPC respectivamente (frente a 0,13 ppm y 0,21 ppm en ausencia de proteína) (Tabla IV.2).

En la Figura IV.4. aparecen representados los cambios en los valores de desplazamiento químico que se producen tanto en el POPA 100% así como en las diferentes mezclas fosfolipídicas de POPC/POPA cuando se añade el dominio C2 ϵ y que ya hemos comentado anteriormente. Paralelamente a estos experimentos, se llevó a cabo un ensayo control consistente en la adición del dominio C2 de la PKC ϵ a la muestra de POPC 100% (Figura IV.4. y Tabla IV.2) donde se produjeron cambios muy pequeños siendo los valores de d.q. de -0.91 ppm y -0,82 ppm en ausencia y presencia de proteína respectivamente. Esto confirma que las interacciones membrana-proteína implican una interacción de tipo electrostático y que por tanto la POPC, por su naturaleza zwitteriónica, no facilita este tipo de interacción. La Figura IV.4. muestra claramente una pendiente más acusada para el caso de la curva debida a POPA que para la debida a POPC, lo que indica de nuevo la especificidad de la interacción del dominio C2 de la PKC ϵ con membranas cargadas negativamente.

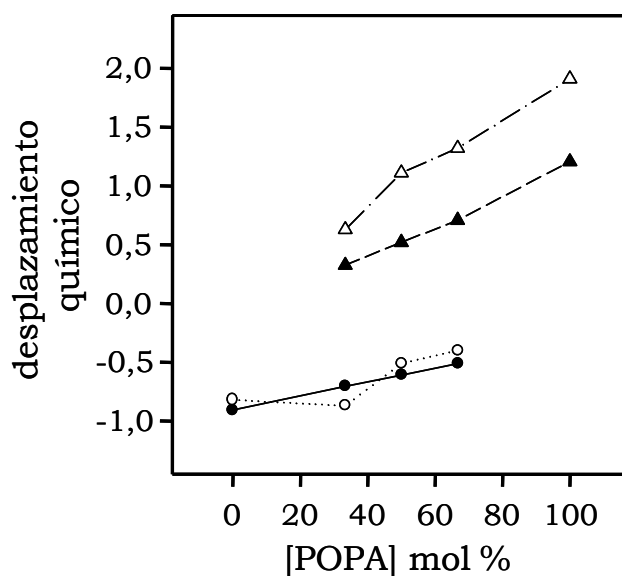


Figura IV.4. Representación gráfica de los valores de desplazamiento químico de los picos isotrópicos de ^{31}P -RMN de vesículas multilamelares de POPC, POPA, o POPC/POPA en función del porcentaje de POPA. Se muestran los porcentajes de POPA en ausencia (●, ▲) o presencia del dominio C2 de la PKC ϵ (○, △). Los círculos corresponden al ^{31}P de la POPC y los triángulos al ^{31}P del POPA.

3.2.3. TIEMPOS DE RELAJACIÓN ^{31}P - RMN MAS.

Se determinaron los tiempos de relajación spin-lattice o tiempos de relajación longitudinal (T_1), de cada fosfolípido en la membrana a partir de los espectros de alta resolución, ^{31}P -RMN MAS, los cuales se obtuvieron a diferentes temperaturas (Figura IV.5).

Así, en el caso del POPA 100% (▲) (Figura IV.5A) las dos primeras temperaturas (5 y 15 °C) produjeron valores de T_1 muy similares, en concreto de 1026 y 1016 ms respectivamente. Sin embargo, el aumento de temperatura a 25 °C produjo una disminución del valor de T_1 a 796 ms. Conforme se elevó la temperatura los valores de T_1 descendieron gradualmente alcanzando un valor T_1 de 409 ms a 60 °C. Probablemente, este cambio brusco se debe a que el comienzo de la temperatura de transición de la fase gel a la fase fluida para el POPA 100% tiene lugar a una T_c : 16 °C (Figura IV.1).

Sin embargo, en el caso de la muestra de POPC 100% (△), se tomaron todas las temperaturas por encima de la temperatura de transición (-4 °C) donde los cambios con temperaturas crecientes no produjeron variaciones en el valor T_1 tan bruscas como en el caso del

POPA. La [Figura IV.5A](#). muestra que a 25 °C se alcanzó el valor de T_1 mínimo siendo de 645 ms. Los valores mínimos de T_1 observados por otros autores para fosfolípidos similares a la POPC oscilaron entre 800-1000 ms a unas temperaturas de ~15 °C para las bicapas de dioleilfosfatidilcolina (Tamm y Seelig, 1983), 0 °C para las bicapas de cardiolipina (Seelig y col., 1981), 25 °C para las de dioleilfosfatidilserina (Spooner y Watts, 1991), 18 °C para dioleilfosfatidilglicerol (Pinheiro y Watts, 1994b) y 37 °C para diacilfosfatidilinositol (Pinheiro y Watts, 1994b). Este valor de tiempo de relajación T_1 mínimo es un valor que proporciona una visión del núcleo del átomo de fósforo ya que no es necesario conocer el mecanismo concreto de relajación para evaluar los tiempos de correlación del movimiento molecular a una temperatura determinada para los valores de T_1 (Seelig y col., 1981). Sin embargo, este valor de T_1 mínimo no se observó para las vesículas que contenían POPA, dentro del rango de temperaturas estudiadas. La presencia de fase gel a bajas temperaturas podría haber impedido su observación.

Paralelamente, también se estudió el efecto sobre los tiempos de relajación de las mezclas de POPC/POPA en la bicapa. Los datos correspondientes al espectro ^{31}P -RMN para el POPA en la mezcla POPC/POPA (relación molar 1:2) mostraron la presencia de tan solo un punto a 5 °C en el cual se encontraba por debajo de la temperatura de transición (17 °C) mientras que de 15 °C a 60 °C se produjo un descenso progresivo y lineal de 1016 a 419 ms ([Figura IV.5B](#)). La [Figura IV.5B](#). (■) muestra claramente que los tiempos de relajación T_1 en fase fluida para el POPA (560 ms a 55 °C) fueron más largos que para el caso de la muestra de POPA 100% (470 ms a 55 °C) ([Figura IV.5A](#)), esto puede ser debido a que las moléculas de POPC se encuentran organizadas entre sus grupos fosfato. Waltham y colaboradores (1986) demostraron que las moléculas de ácido fosfatídico establecen puentes de hidrógeno entre sus grupos fosfato. Estas uniones se pueden interrumpir por la presencia de moléculas de POPC, reduciendo así la densidad de carga en la superficie de la membrana lo que conduce a un cambio en la conformación de los grupos fosfato de las moléculas de POPA y que se manifiesta en unos valores de T_1 más elevados. De hecho, este efecto se puede observar tanto en las mezclas POPC/POPA (1:2) ([Figura IV.5B](#)) (□) como en POPC/POPA (2:1) ([Figura IV.5C](#)).

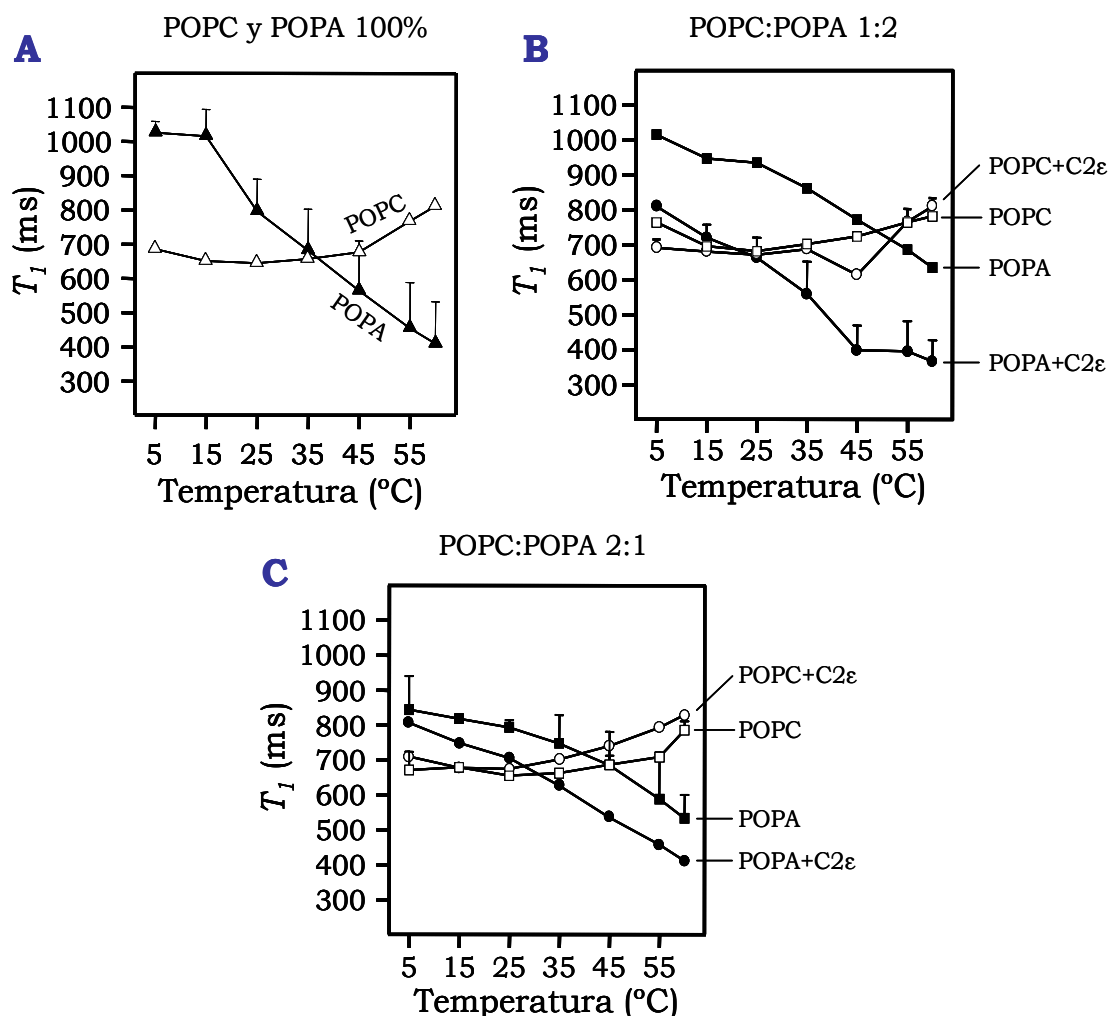


Figura IV.5 Representación gráfica de los tiempos de relajación, T_1 , de los espectros ^{31}P -RMN MAS de POPA, POPC o de las diferentes mezclas POPC/POPA utilizadas en presencia y ausencia de C2 ϵ . Se muestran los tiempos de relajación (T_1) en función de la temperatura de los espectros ^{31}P de vesículas multilamelares compuestas por lípido POPC 100% (Δ) o POPA 100% (\blacktriangle) (A), así como las mezclas POPC/POPA relación molar 1:2 (B) y POPC/POPA relación molar 2:1 (C). ^{31}P debido a POPC en ausencia (\square) o presencia de C2 ϵ (\circ), ^{31}P debido a POPA en ausencia (\blacksquare) o presencia del dominio C2 de la PKC ϵ (\bullet).

Sin embargo, en presencia del dominio C2 de la PKC ϵ los valores de T_1 para el POPA cambiaron en todas las temperaturas hacia valores más bajos tanto en las muestras POPC/POPA relación molar 1:2 como en la 2:1 (Figuras IV.5B y IV.5C) (\bullet). Esta reducción de los valores de T_1 sería el resultado de la interacción electrostática del dominio C2 de la PKC ϵ con la superficie de la membrana cargada negativamente. En este sentido, se han observado resultados similares en la unión de otras proteínas básicas a membranas que contienen ácido fosfatídico y otros fosfolípidos cargados

negativamente. Así, se observó este efecto en el citocromo *c* y se interpretó que la unión de la proteína producía restricciones en los movimientos de las cabezas polares, lo que disminuye la densidad espectral de los movimientos rápidos (a una escala de tiempo de 10^{-9} ms) (Waltham y col., 1986). Otras proteínas de carácter básico también son capaces de producir una disminución de T_1 de fosfolípidos cargados negativamente como es el caso de la poli-(L)-lisina, la lisozima o la ribonucleasa (Smith y col., 1983).

También es de destacar los pequeños efectos observados en los valores de T_1 para el caso de la POPC tanto en presencia de POPA o POPA y C2 ϵ demostrándose así la baja susceptibilidad a interacciones electrostáticas (Figura IV.5) (\square y \circ).

Por último, también se midieron los tiempos de relajación *spin-spin* o tiempos de relajación transversal (T_2) para la muestra POPC/POPA (relación molar 1:1) tanto en ausencia como en presencia del dominio C2 de la PKC ϵ (relación molar lípido/proteína, 40:1). Los resultados mostraron un descenso en los valores de T_2 siendo de 22,3 ms y 22,6 ms para POPA y POPC y en ausencia de proteína respectivamente; y de 11,35 ms y 16,42 ms en presencia del dominio C2 ϵ . Todo ello concuerda con el ensanchamiento observado en los picos isotrópicos de los espectros ^{31}P -RMN MAS (ver Tabla IV.2).

3.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (FT-IR).

Se utilizó la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) para una mejor caracterización de la interacción de la proteína con los fosfolípidos. El objetivo era detectar varios grupos importantes presentes en la molécula de fosfolípido, en concreto la vibración debida al grupo carbonilo (C=O) situada entre la región 1700-1760 cm^{-1} . La muestra de POPA 100% a 30 °C presentó una banda ancha, que mediante la segunda derivada y la desconvolución, se descompuso en dos componentes, una situada a 1742 cm^{-1} con una contribución del 44% del total de la banda estudiada y la otra centrada a 1723 cm^{-1} con una aportación del 56% (Figura IV.6A). Tal y como sugirieron el grupo de Blume y colaboradores (1988) la componente de alta frecuencia se puede atribuir a los grupos carbonilo no hidratados mientras que la otra componente se puede asignar a los grupos carbonilo hidratados. Por otro lado, se ha

demostrado que la interacción de determinadas moléculas con fosfolípidos puede cambiar la proporción de ambos tipos de fosfolípidos así como la hidratación de los grupos carbonilo (López-García y col., 1993; Swairjo y col., 1994). Cuando se añadió el dominio C2 de la PKC ϵ a vesículas compuestas por POPA se modificó el perfil de la banda del carbonilo de modo que la componente situada a alta frecuencia (1742 cm^{-1}) disminuyó su área considerablemente (37%) y por tanto, la componente a 1725 cm^{-1} aumentó considerablemente (63%). Estas variaciones en los porcentajes indican un cambio conformacional importante en la cabeza polar del POPA de forma que se produce un aumento en el porcentaje de los grupos C=O hidratados como consecuencia de la presencia de proteína (Figura IV.6B). Es de destacar que el cambio observado es exactamente el opuesto para el caso del ácido fosfatídico cuando se le añadieron iones Ca^{2+} en cuyo caso la componente que aumenta considerablemente es la de alta frecuencia (Laroche y col., 1991). Sin embargo, este cambio es similar al de otras proteínas que también interaccionan con POPA como la proteína de mielina básica bovina (Nabet y col., 1994) y la cardiotoxina (Desormeaux y col., 1992). La Figura IV.6C. muestra que cuando el ácido fosfatídico se encuentra en estado disociado (p.e. a pH 10) las componentes se localizan a 1742 cm^{-1} y a 1725 cm^{-1} con unas contribuciones del 31% y del 69% respectivamente.

La otra parte del espectro que se estudió fue la región comprendida entre 1300 y 1000 cm^{-1} , donde las vibraciones de los grupos fosfato dan lugar a dos bandas en el espectro de infrarrojo, una localizada a 1178 cm^{-1} que se puede asignar al grupo PO_2^- antisimétrico y la otra localizada a 1077 cm^{-1} que corresponde a la vibración del PO_2^- simétrico y a otras vibraciones que también se solapan en la misma región del espectro, lo que hace que esta banda sea más compleja de estudiar (Laroche y col., 1991). En lo que respecta al PO_2^- antisimétrico, es de destacar que el ácido fosfatídico aparece a un número de onda más bajo que otros fosfolípidos como la fosfatidilserina o la fosfatidilcolina, las cuales se sitúan a $\sim 1220 \text{ cm}^{-1}$. Los puentes de hidrógeno que se establecen entre las moléculas de POPA son las responsables de que el número de onda sea tan bajo. Para observar el efecto de la proteína en esta parte del espectro, los espectros tanto de POPA 100% así como el de POPA con dominio C2 ϵ se normalizaron con respecto a la vibración del CH_2 antisimétrico que aparece a 2854 cm^{-1} y que puede ser atribuida casi exclusivamente a

lípidos. Lo que se observó fue un descenso en la intensidad de la banda del fosfato como consecuencia de la presencia de proteína, lo que indica que la proporción del PO_2^- descendió a favor del PO_2^{2-} (datos no mostrados) aunque el número de onda no se modificó.

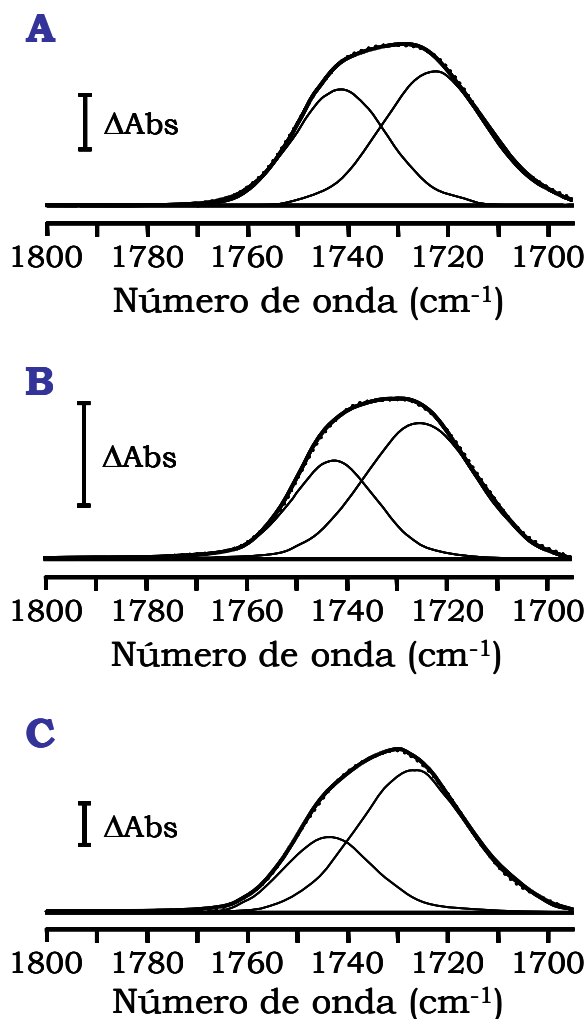


Figura IV.6 Espectros FT-IR de la región del carbonilo (C=O) comprendida entre 1760-1700 cm^{-1} del modo de vibración de los lípidos fosfolípidos a 30 °C en D_2O . Se muestra la región comprendida entre 1800-1700 cm^{-1} donde se distingue la banda del carbonilo (C=O) del lípido POPA resultante de la sustracción del tampón correspondiente sin lípido. El tampón estaba compuesto por: HEPES 25 mM (pD 7,8; pH 7,4), KCl 10 mM y EGTA 0,1 mM o Glicina (pD 10,4; pH 10), KCl 10 mM y EGTA 0,1 mM. (A) POPA 100% a pH 7,4, (B) POPA en presencia del dominio C2 de la PKC ϵ a pH 7,4, (C) POPA 100% a pH 10. La relación molar lípido/proteína utilizada fue 40:1. El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue de 0,01 para A y B, y de 0,02 para C. La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original. 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 obtención de los espectros de infrarrojo y el tratamiento de los datos se especifican en el apartado 2.5.2.1. del Capítulo II de esta Memoria.

Además de la vibración del grupo PO_2^- simétrico a 1077 cm^{-1} (Laroche y col., 1991) esta banda también se puede asignar a las vibraciones C-O-(P), P-O-(C) y P-O-(H) las cuales son bastante sensibles a la densidad de carga del grupo fosfato (Laroche y col., 1991). La presencia de proteína pura también absorbe en esta zona del espectro, y dada la complejidad adicional de la banda no se pueden establecer conclusiones de la misma.

Por último, hay que decir que no es posible cuantificar el efecto detectado por espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) en términos de porcentaje de moléculas de lípido afectadas por la presencia de proteína. De modo que tan sólo hemos realizado un estudio cualitativo indicando que un número de moléculas se ven afectadas por la interacción con la proteína.

4. DISCUSIÓN.

Muchas proteínas extrínsecas utilizan fuerzas electrostáticas para interactuar con membranas y difieren de las proteínas intrínsecas en que estas últimas interactúan a través de interacciones de tipo hidrofóbico (Chapman y col., 1982). Entre las proteínas extrínsecas que establecen interacciones con las membranas y que han sido ampliamente estudiadas se encuentran el citocromo *c* (Rietveld y col., 1986; Waltham y col., 1986; Pinheiro y Watts, 1994a; Pinheiro y Watts, 1994b; Rytomaa y Kinnunen, 1995), la proteína mielina básica (Smith y col., 1983; MacNaughtan y col., 1985; Jo y Boggs, 1995), fosfolipasas (Rebecchi y col., 1992; Roberts, 1996), proteínas quinasas C (PKC) (Newton y Johnson, 1998; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006), K-Ras (Hancock y col., 1990), cardiotoxina (Carbone y Macdonald, 1996) y péptidos Aβ (Martínez-Senac y col., 1999; Bonev y col., 2001; Bokvist y col., 2004) alguno de los cuales han sido estudiados mediante RMN-MAS (Pinheiro y Watts, 1994a; Pinheiro y Watts, 1994b; Carbone y Macdonald, 1996; Bonev y col., 2001; Bokvist y col., 2004).

Muchas de las proteínas implicadas en la transducción de señales son activadas cuando se encuentran ancladas a la membrana (Hancock y col., 1990; Roberts, 1996; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006). La mayoría de ellas se localizan en ésta mediante su unión a fosfolípidos cargados negativamente y localizados en la cara interna de la bicapa lipídica. Esto es posible debido a la

disposición asimétrica de los lípidos en las membranas, así p.e. en las proteínas de la sangre, esta disposición evita la coagulación inadecuada.

Algunas de las proteínas, implicadas en la transducción de señales, que pueden establecer interacciones electrostáticas con las membranas presentan dominios C2 como es el caso de las PKC (Newton y Johnson, 1998; Corbalán-García y Gómez-Fernández, 2006) y las sinaptotagminas (Bai y Chapman, 2004). En el caso de los dominios C2 dependientes de Ca^{2+} , este catión actúa como un puente entre los fosfolípidos cargados negativamente tales como fosfatidilserina y los residuos aminoacídicos de la proteína como es el caso del dominio C2 de la $\text{PKC}\alpha$ (Verdaguer y col., 1999; Ochoa y col., 2002). Sin embargo, esos dominios también podrían establecer interacciones electrostáticas directas con los fosfolípidos como el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ a través de residuos cargados positivamente como las lisinas (Corbalán-García y col., 2003a; Marín-Vicente y col., 2005; Sánchez-Bautista y col., 2006).

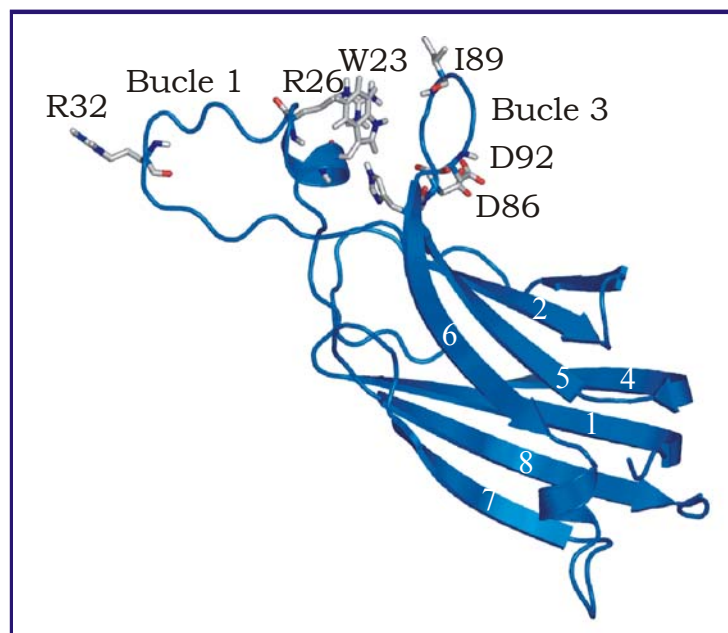


Figura IV.7. Modelo estructural de la región del dominio C2 ϵ implicada en la unión a lípidos. Este modelo está basado en la estructura 3D resuelta por Ochoa y colaboradores (2001) (código en PDB 1GMI). Aparecen representadas las cadenas laterales de los residuos posiblemente implicados en la unión a los lípidos. De acuerdo con este modelo, la unión a la membrana implica interacciones de tipo electrostático por parte de los residuos Arg26 y Arg32 con los fosfolípidos cargados negativamente, interacción reforzada por la inserción de la Ile89 en la región hidrofóbica y por la inserción del Trp23 en la interfase lípido-agua.

El modo de interacción con la membrana de los dominios C2 de las PKC nuevas, como el caso de la PKC ϵ , no se conoce con tanto detalle por no haberse conseguido la visualización del lípido en co-cristalización del lípido y la proteína (Ochoa y col., 2001). No obstante, se sabe que los residuos aminoacídicos interactúan directamente con los fosfolípidos en ausencia de Ca²⁺. Trabajos previos utilizando la técnica de difracción de rayos X y mutagénesis dirigida (Ochoa y col., 2001; Corbalán-García y col., 2003b; López-Andreo y col., 2003) mostraron que la interacción tiene lugar a través de los residuos Trp23, Arg26 y Arg32 situados en el bucle 1 e Ile89 localizado en el bucle 3 del dominio C2, siendo estos residuos los responsables de la interacción electrostática con la membrana (Corbalán-García y col., 2003b). La [Figura IV.7.](#) presenta el modelo de unión a la membrana donde se reflejan las observaciones obtenidas en este capítulo, con el residuo de Trp23 localizado la superficie de contacto lípido-agua mientras que Arg26 y Arg32 interactúan con los fosfolípidos cargados negativamente. Es de destacar que el residuo de Ile89 penetra a través de su cadena lateral en la región hidrofóbica considerando que esta mutación interrumpe gravemente la interacción del dominio C2 ϵ con la membrana (Ochoa y col., 2001).

Este trabajo confirma que el dominio C2 de la PKC ϵ interactúa con la membrana a través de interacciones de naturaleza electrostática, con una pequeña contribución de interacciones de tipo hidrofóbico tal y como se indicó mediante DSC ([Figura IV.1](#)). Así, mediante los experimentos de RMN-MAS hemos estudiado que el dominio C2 ϵ interactúa mejor con POPA que con POPC lo que demuestra que la afinidad diferencial se debe a interacciones de tipo electrostático. Esto se refleja por el cambio a bajo campo del pico isotrópico del POPA así como por el incremento de anchura en el pico. Además, la disminución en los tiempos de relajación T_2 así como en los tiempos de relajación T_1 a todas las temperaturas, se interpreta como un descenso en la movilidad de los fosfolípidos. Todos estos efectos fueron mucho más notables en el POPA, mientras que para la POPC fueron muy pequeños, lo que indica la especificidad de la interacción.

El mutante C2 ϵ -W23A/R26A/R32A se utilizó como control para demostrar que la eliminación de los residuos cargados positivamente produce una disminución de la afinidad por el lípido negativo POPA ([Figura IV.2B](#)).

Es interesante destacar que la adición de POPC a POPA produjo un aumento en el valor de T_1 debido a que las interacciones entre las cabezas polares negativas del POPA disminuyen por la inserción de la POPC lo que produce la rotura de estas interacciones. La reducción en los valores T_1 , inducida por la presencia de proteína a todas las temperaturas estudiadas (Figura IV.5), refleja un mecanismo de relajación más eficiente. Estos resultados confirman la especificidad de la proteína y su efecto sobre el POPA, mientras que el descenso en dichos valores indica la restricción de movimiento en las cabezas polares lo que disminuye la densidad espectral de los movimientos rápidos del átomo de fósforo.

Si comparamos el efecto del dominio C2 de la PKC ϵ con el que se produce por los iones Ca^{2+} , se puede observar que el Ca^{2+} produce un aumento del valor de T_1 (Hope y Cullis, 1980). El dominio C2 de la PKC ϵ al igual que otras proteínas como el citocromo *c*, se comporta como cationes monovalentes y algunos cationes divalentes que actúan como counteriones dentro de la bicapa lipídica eléctrica (Portis y col., 1979; McLaughlin, 1989). Este tipo de efecto es compatible con que no hayamos observado separación de fases mediante DSC tras la adición de las diferentes mezclas de POPC/POPA.

La unión del dominio C2 de la PKC ϵ produce un aumento en el nivel de ionización del grupo PO_2^- del POPA, esto provoca cambios en la conformación de algunos grupos polares del fosfolípido lo que se manifiesta en un aumento del porcentaje de hidratación del grupo carbonilo del POPA (Figura IV.6). También es de destacar que el aumento en los desplazamientos químicos de los espectros ^{31}P -RMN confirma la fuerte disociación del grupo fosforilo del POPA y con ello una disminución en el pK_a aparente de este grupo químico (Swairjo y col., 1994; Kooijman y col., 2005). El ácido fosfatídico es un fosfolípido muy especial ya que es el único que posee un pK_a en el rango fisiológico, y su estado protonado puede cambiar en función de su interacción con otros lípidos o proteínas (Swairjo y col., 1994; Kooijman y col., 2005). Normalmente, estas interacciones implican uniones por puentes de hidrógeno lo que podría ser importante para diferentes funciones celulares.

Para interpretar los resultados obtenidos, deberíamos tener en cuenta el hecho de que no se observó separación de fases en las mezclas POPC/POPA en DSC y que todas las moléculas de POPA exhibieron unos desplazamientos químicos a bajo campo así como también cambiaron sus valores de T_1 tras la adición de proteína, aunque la relación molar utilizada fuera lípido:proteína 40:1. Por tanto, no se observaron dos poblaciones de POPA distintas, sino que un número pequeño de proteínas son capaces de alterar el ambiente de un gran número de moléculas de lípido. Si este volumen de perturbaciones observadas es debido a la interacción entre la proteína y la cabeza polar del lípido, este hecho debe ocurrir en el sistema a una velocidad de intercambio límite de modo que cada lípido interacciona con una o más proteínas a una escala de tiempo de RMN. Puesto que esta escala de tiempo puede ser asumida en torno a 10^{-4} - 10^{-5} s, esta técnica no puede separar dos estados de intercambio a una escala más rápida que 10^4 - 10^5 s $^{-1}$. Además, puesto que la tasa de difusión de los lípidos en una membrana fluida nos informa de que el tiempo necesario para que un fosfolípido intercambie su posición con un lípido adyacente es de aproximadamente 10^{-7} s (Träuble y Sackmann, 1972), esto indica que es factible el hecho de que 40 moléculas de fosfolípido puedan interactuar con la proteína y sólo un único tipo de lípido sea detectado. Es de destacar que los valores de T_1 (Figura IV.5) promedios y los valores de T_1 para las moléculas de POPA que se unen a la proteína deberían ser más pequeños que los realmente observados. Esta situación es similar a lo que ocurre con las proteínas intrínsecas que interactúan con fosfolípidos (Chapman y col., 1982).

La otra posibilidad es que la baja densidad de moléculas de proteína unidas a la superficie de la membrana pueda alterar el ambiente de todos los grupos polares lipídicos simultáneamente por una reorganización conformacional de estos grupos. Tal reorganización conformacional podría alterar los valores de pK_a de los grupos polares, lo que podría alterar sucesivamente los valores de desplazamiento químico y los tiempos de relajación. Los datos de infrarrojo apoyan esta segunda interpretación. Lo que está claro es que la proteína produce un cambio general en la conformación de las cabezas polares del lípido, lo que podría explicarse por todos los efectos que hemos observado en los parámetros de RMN estudiados para la población de POPA. Sin embargo, cuando se consideran los

datos de infrarrojo, no es posible cuantificar este efecto en términos de porcentaje de moléculas lipídicas afectadas y por tanto, no podemos excluir el modelo de disociación rápida para explicar nuestros resultados.

Con estos datos, podemos establecer un modelo en el cual algunos residuos de carga positiva del dominio C2 ϵ pueden alterar la difusión de los lípidos en la bicapa, induciendo la alteración del valor de pK_a aparente del POPA, lo que se deduce por el cambio a bajo campo en los valores de desplazamiento químico de los experimentos de RMN y de los datos de infrarrojo. Si embargo, no podemos excluir la posibilidad de que algunos lípidos se unan a la proteína en un momento dado, en un movimiento más rápido que en el tiempo de escala estudiado, y por tanto, fuera de nuestro alcance y detección.

Por tanto, ambas interpretaciones serían parcialmente factibles de modo que no todas las moléculas de lípido se afectan por la presencia de proteína al mismo tiempo y por otro lado, que no solo aquellas moléculas que contactan con la proteína se ven afectadas en un momento dado.

También es importante mencionar que los tiempos de relajación T_2 *spin-spin* corroboran el ensanchamiento de los picos observados en los espectros de RMN (Tabla IV.2). La explicación más probable parece ser una reducida movilidad de los lípidos con respecto a la bicapa, afectando especialmente al POPA debido a su sensibilidad en presencia de proteína. No tenemos evidencias experimentales de la existencia de microambientes derivados, por ejemplo, de diferentes densidades locales de proteína unida.

En resumen, el dominio C2 de la PKC ϵ muestra una preferencia por el POPA sobre POPC, mientras que la interacción electrostática que se establece produce un cambio conformacional en las cabezas polares del POPA. Estas observaciones confirman el papel del POPA en el proceso de activación de la PKC ϵ tal y como se sugirió en estudios *in vivo* (López-Andreo y col., 2003) para que esta enzima se encuentre regulada a través de la actividad de la fosfolipasa D.

1. RESUMEN

Los dominios C1 de las PKC α y PKC η están implicados en el reconocimiento específico de DAG y también pueden ser la diana de ésteres de forbol. El propósito de este trabajo ha sido estudiar la interacción entre los dominios C1B de las PKC α y PKC η y diferentes tipos de diacilgliceroles (DAGs), en presencia de distintos lípidos negativos. Para ello, hemos utilizado la técnica de transferencia de energía por fluorescencia (FRET). Esta técnica requiere la presencia de un fluoróforo aceptor y un fluoróforo dador. En nuestro estudio, la ausencia de residuos de Trp en la secuencia nos llevó a diseñar una construcción consistente en la fusión de los dominios C1B a la proteína verdeazulada fluorescente (CFP).

En primer lugar se estudió la capacidad de unión de estos dominios C1B a membranas que contenían fosfolípidos aniónicos, como POPS, POPA y POPG, en ausencia de DAGs. El resultado fue una relativamente alta afinidad por parte del dominio C1B ϵ para unirse a membranas que contuvieran cualquiera de los tres fosfolípidos, y una afinidad algo más baja por parte de los otros dos dominios. El dominio C1B γ mostró una gran preferencia por POPA, el dominio C1B δ mostró una afinidad muy baja por POPG. Por tanto, de los tres fosfolípidos estudiados el que mejor estimuló la translocalización de los dominios a la membrana, en ausencia de diacilgliceroles, fue el POPA.

La inclusión de 5 moles % de DOG y concentraciones crecientes de los lípidos negativos anteriores produjo un cambio en el patrón de afinidades aunque el dominio C1B ϵ fue el dominio que mostró mayor capacidad de unión, presentando mayor afinidad por el POPA. Por su parte, el dominio C1B γ presentó mayor afinidad por POPA y el dominio C1B δ presentó valores de afinidad muy similares con ambos lípidos negativos.

Además del DOG, también se estudió la afinidad de estos dominios C1B en presencia de otros DAGs, como el SAG y el DPG, en presencia de 40 moles % de lípido negativo (POPS, POPA o POPG). En presencia de 15 moles % de DOG, la capacidad de unión por parte del dominio C1B ϵ fue muy elevada con unos valores de K_D : 0,1, 1,8 y 1,1 μ M en presencia de POPA, POPS y POPG respectivamente. Cuando se estudió el lípido SAG, de nuevo el dominio que mostró mayor afinidad fue el dominio C1B ϵ con un valor de K_D : 0,2 μ M en presencia de POPA. Este valor descendió del orden de 30 y de 10 veces cuando se utilizaron los otros lípidos negativos, POPS y POPG respectivamente. Igualmente, el dominio C1B γ presentó mayor afinidad por POPA frente al resto de fosfolípidos estudiados. Sin embargo, el dominio C1B δ presentó mayor afinidad en presencia de POPG. La utilización de DPG, un lípido saturado, produjo un aumento generalizado de las constantes de afinidad para cada uno de los dominios estudiados. Esto se puede atribuir a un proceso de rigidificación de la membrana debido a la fase gel del lípido.

El estudio detallado de los DAGs anteriormente comentados en presencia de 40 moles % de POPS o POPA, nos llevó a concluir que todos los dominios tienen preferencia por los diacilgliceroles insaturados (DOG y SAG) con respecto a los saturados y que al comparar entre DOG y SAG, C1B δ y C1B ϵ muestran una preferencia por DOG, mientras que, al menos en presencia de POPS, C1B γ prefiere SAG.

2. INTRODUCCIÓN.

Se puede clasificar a las isoenzimas de las PKC, en base a sus propiedades bioquímicas, en PKCc (α , β I y β II y γ) que necesitan DAG y Ca²⁺ para su activación, en PKCn (δ , ϵ , θ y η) su unión a DAG es independiente de Ca²⁺ y por último las PKCa (ζ , ι/λ) que no requieren DAG ni Ca²⁺ para su activación. Todas ellas poseen en su región reguladora, además del dominio C2, un dominio C1. Este dominio C1 se caracteriza porque posee un motivo rico en residuos de Cys e His (Hubbard y col., 1991) y suele aparecer duplicado en tandem en las PKCc y PKCn mientras que sólo aparece una copia en las PKCa.

Estructuralmente, el dominio C1 consta de dos hojas β -antiparalelas formadas por 3 y 2 cadenas, seguidas por una hélice- α localizada en el extremo carboxilo terminal (Hubbard y col., 1991; Ichikawa y col., 1995). La parte superior del dominio C1 además de poseer los sitios de coordinación de iones Zn²⁺, compuestos por residuos de Cys e His de la región amino y carboxilo terminal y que son esenciales para el plegamiento adecuado de la proteína, también está formada por residuos de naturaleza hidrofóbica mientras que la parte intermedia del dominio se encuentra compuesta, principalmente, por residuos cargados positivamente. La presencia de diferentes ligandos como el DAG o los ésteres de forbol, crea una superficie hidrofóbica continua que permite la inserción del dominio C1 en el interior de la membrana. Así, los residuos cargados positivamente interactúan con los fosfolípidos con carga negativa de la membrana, explicando así la preferencia que poseen por fosfolípidos ácidos como cofactores para la unión de ligandos (Zhang y col., 1995).

Los dominios C1 están implicados en el reconocimiento específico del 1,2-*sn*-diacilglicerol (DAG) y/o de los ésteres de forbol denominándose *C1 típicos* y reciben el nombre de *C1 atípicos* los que se encuentran en las PKCs atípicas que no ligan ninguno de estos

dos tipos de activadores (Castagna y col., 1982). La unión del DAG a los dominios C1 de las PKC produce su activación lo que conlleva procesos tan importantes como son la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Yang y Kazanietz, 2003; Brose y col., 2004). Los ésteres de forbol son sustancias naturales promotoras de tumores que se unen a los dominios C1 de las PKC siendo capaces de mimetizar la acción del DAG, afectando por tanto a estas funciones.

El DAG es un segundo mensajero muy importante (Kajikawa y col., 1989; Dekker y Parker, 1994) que no suele estar en membranas biológicas de células en estado de reposo, sino que se genera tras la estimulación de ciertos receptores de la superficie celular, a través de distintas enzimas como las fosfolipasas C (PLC), las fosfolipasas D y las diacilglicerol quinasas (DAK). Así, tras la activación de la PLC se produce la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂) generando los segundos mensajeros DAG e Ins(3,4,5)P₃. Una vez sintetizado, el DAG se metaboliza rápidamente por la diacilglicerolquinasa (DGK), que genera ácido fosfatídico como resultado de su actuación. No obstante, es relativamente frecuente que tras este primer descenso de los niveles de DAG, se produzca un nuevo aumento de la presencia de DAG en la membrana, debido nuevamente a la actuación de la PLC, que lo sintetiza partiendo de fosfatidilcolina (PC) (Lee y col., 1991, Holbrook y col., 1992, Lassegue y col., 1993, Jarpe y col., 1994). El DAG procedente de esta segunda vía, permanece en la membrana durante más tiempo, ya que es peor sustrato de la DGK, y su metabolización, mucho más lenta, está catalizada por la DAG-lipasa (Ford y Gross, 1990, Lee y col., 1991).

Al menos existen 50 tipos distintos de 1,2-*sn*-diacilglicerol (Pessin y Raben, 1989; Pettitt y Wakelam, 1993) cuyas cadenas pueden ser poli-insaturadas, di-insaturadas, mono-insaturadas o saturadas. La mayoría de estas especies son capaces de activar a las PKC *in vitro*, pero existen un mayor preferencia por las especies di-insaturadas como el 1,2-*sn*-dioleilglicerol (DOG) o poli-insaturadas como el ácido 1,2-*sn*-estearil-araquidonilglicerol (SAG) (Marignani y col., 1996; Schacter y col., 1996). Su capacidad para activar a las PKCs depende de la longitud de sus cadenas laterales y de la saturación o insaturación de estas cadenas (ver referencias en las siguientes revisiones: Gómez-Fernández y col., 2004; Carrasco y Mérida, 2006).

Existen otras proteínas distintas de las PKC capaces de unir DAG como las diacilglicerol quinasas (Kano y col., 1993), la proteína quinasa D (PKD) (Valverde y col., 1994), quimerinas (Hall y col., 1990) RasGRPs (Ebinu y col., 1998), munc13 (Betz y col., 1997), vav (Coppola y col., 1991), raf (Ghosh y col., 1994), ROCK (Ishizaki y col., 1996), Citron (Madaule y col., 1995), Lfc (Whitehead y col., 1995) y C1-TEN (Hafizi y col., 2002). Todas estas proteínas se caracterizan por poseer en su secuencia al menos un dominio C1 que se encuentra altamente conservado. Este dominio, puede presentar diferente especificidad por el DAG. Este rango de especificidad y afinidad aumenta la complejidad de las numerosas respuestas dependientes de DAG que se pueden llevar a cabo en el interior de la célula lo que también explicaría la discriminación que realizan las proteínas diana por los distintos reservorios de DAG existentes en la célula.

La importancia de investigar estos compuestos diana ha ido aumentando en la última década ya que la elucidación de los receptores para el DAG y para los ésteres de forbol así como la determinación de la regulación de estas componentes y las posibles vías de activación nos permitirían determinar moléculas que actuaran como dianas farmacológicas en procesos patológicos tan importantes como el cáncer. Sin embargo, el hecho de que tanto el DAG como los ésteres de forbol no sean dianas exclusivas de las PKC hacen que el abanico de posibilidades sea mucho más amplio y que las señales producidas por el DAG puedan proceder de las PKCs o proteínas distintas de éstas siendo aún más difícil encontrar estrategias terapéuticas que ayuden a modular la actividad de la PKC.

Es de destacar, no obstante, que la mayoría de los trabajos que se han realizado sobre los dominios C1 han sido en base a su interacción con ésteres de forbol y muchos menos han versado sobre su interacción con DAGs. Sin embargo, los DAGs son los activadores fisiológicos de estos dominios que muy raramente se van a encontrar con ésteres de forbol que son tóxicos de origen vegetal o sintético. Está, además, bien documentado que son diferentes la forma de interacción de los C1s con los ésteres de forbol y con los DAGs (Oancea y col. 1998). Además los ésteres de forbol y los DAGs no interaccionan con la misma afinidad con los diferentes subdominios

C1 (Burns and Bell, 1991; revisado por Corbalán-García y Gómez-Fernández; 2006).

Por todo ello resulta conveniente el realizar más estudios sobre la interacción entre C1s y sus ligandos fisiológicos que son los DAGs, con objeto de comparar la capacidad de enlace de los diferentes dominios y de establecer su posible especificidad.

En este trabajo hemos estudiado subdominios C1B de distintas isoenzimas, para caracterizar la afinidad de unión a membranas compuestas por distintos lípidos negativos así como la especificidad que presentan para interaccionar con distintos tipos de diacilgliceroles (DAGs), concluyéndose que hay grandes diferencias entre el C1B α , el C1B ϵ , el C1B δ y el C1B γ .

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El propósito de este trabajo ha sido estudiar la afinidad de unión de los dominios C1 de las PKC a diferentes (DAGs) en presencia de distintos fosfolípidos aniónicos como POPS, POPS y POPG. Se ha comparado la capacidad de translocarse a membranas modelo de cuatro dominios C1B diferentes, PKC γ (clásica) y PKC δ y PKC ϵ (nuevas). También se ha intentado utilizar el dominio C1B de la PKC α (clásica), pero su capacidad de enlazarse a membranas con DAGs resultó ser demasiado baja como para poder determinar sus propiedades con fiabilidad (resultados no mostrados).

Para realizar este estudio de interacciones moleculares se empleó una técnica de fluorescencia mediante transferencia de energía por resonancia (FRET) que permite realizar medidas muy sensibles y que se puede realizar con muestras muy diluidas con las ventajas que ello conlleva de ahorro de muestra y fiabilidad.

La carencia de residuos de Trp adecuados en los dominios C1B de estudio, hizo necesario el diseño de una proteína de fusión a la que se incorporó la proteína verdeazulada fluorescente (o cianoproteína fluorescente, CFP; para más detalle véase el [apartado 1.3](#) del Capítulo II de la presente Memoria) ([Figura V.1](#)). Esta proteína se expresó además en células de mamífero lo que permitió obtener proteínas perfectamente plegadas y que se utilizaron como donadores de fluorescencia. Como aceptor de la fluorescencia se utilizó la sonda

verde-Oregón unida a fosfatidiletanolamina (Oregon green®-dPE), incorporada a las membranas fosfolipídicas.

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 C1 con estas membranas (para más detalle véase el [apartado 2.3](#) del Capítulo II de la presente Memoria).

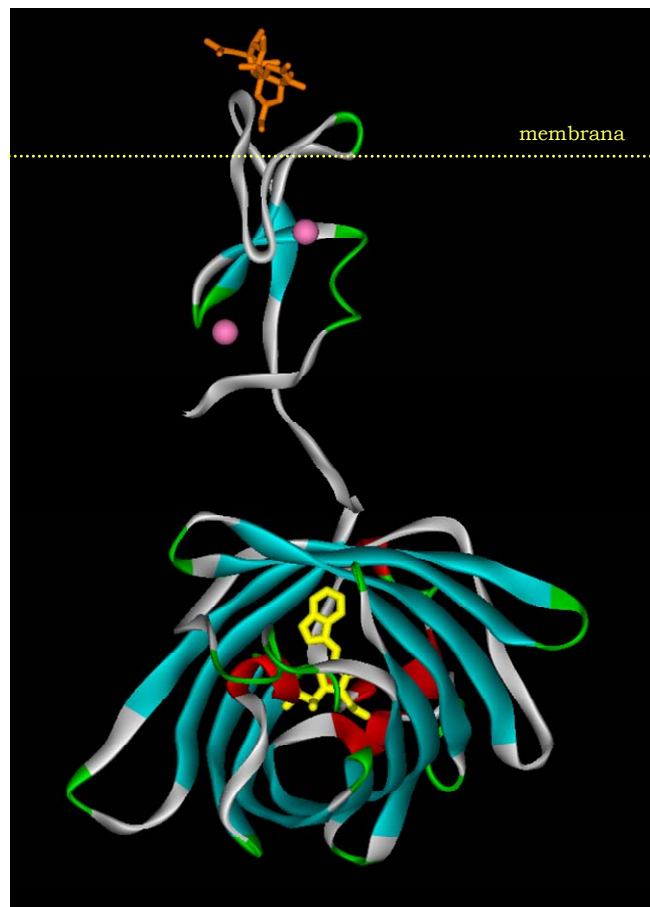


Figura V.1. Modelo estructural de la construcción C1-CFP utilizada para medir la interacción de los dominios C1 de las PKC a diferentes ligandos mediante FRET. En la parte superior aparece el dominio C1By en modelo de cintas (código PDB 1CVZ) anclado a la membrana a través de una molécula de PMA (forbol 12-miristato-13-acetato) (en color rojo). Los iones Zn^{2+} aparecen representados como esferas rosas. A su vez, aparece fusionada la proteína cian fluorescente (CFP) en la parte inferior (código PDB 1HUY). Los residuos de la proteína CFP implicados en la fluorescencia se muestran en amarillo.

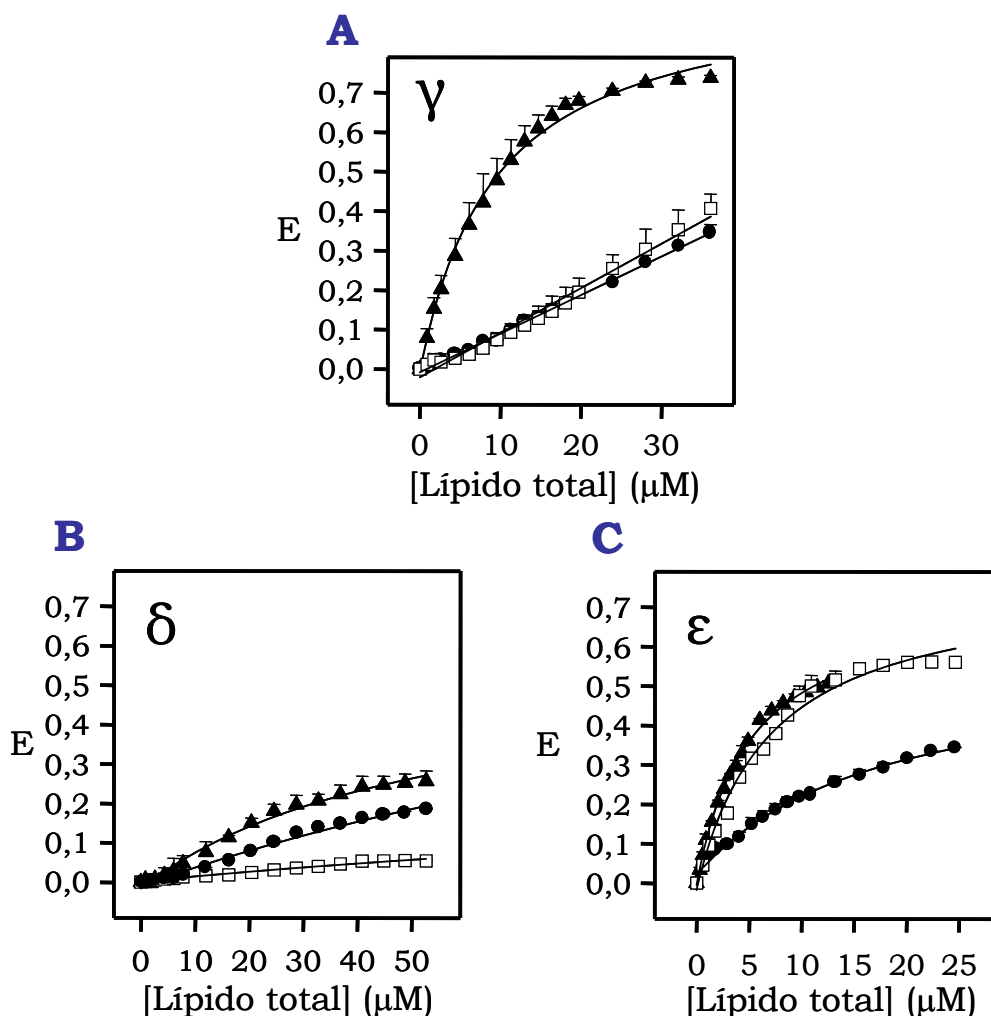


Figura V.2. Unión de los dominios C1B-CFP a diferentes tipos de lípidos negativos. Se llevaron a cabo las valoraciones de unión de los dominios C1B-CFP de las isoenzimas γ (A), δ (B) y ϵ (C) en presencia de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/POPX/OG-dPE relación molar (55:40:5) siendo POPX cada uno de los lípidos negativos utilizados: POPS (\bullet), POPA (\blacktriangle) o POPG (\square). El tampón utilizado fue: Hepes 20 mM (pH 7,4) y KCl 100 mM. 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 3 y 4 nm respectivamente para todos los experimentos de fluorescencia llevados a cabo. La unión de los distintos dominios C1 aislados a diferentes tipos de lípido negativo se determinó mediante la variación de la fluorescencia de la proteína cian fluorescente (CFP) en función de la concentración de lípido total. La fluorescencia de la proteína CFP se determinó utilizando una longitud de onda de excitación de 433 nm (λ_{ex}) y se recogió la emisión de fluorescencia a 473 nm (λ_{em}). También se analizó una cubeta con el dominio C1B-CFP donde se añadieron los mismos volúmenes de vesículas que no contenían lípido negativo, también se analizó otra cubeta con tampón y sin dominio C1B donde se añadieron las diferentes inyecciones de vesículas con lípido negativo. De esta forma, el control de la atenuación de la CFP seguido de la corrección de la dilución de la muestra, fueron sustraídos de los datos de la titulación de los distintos C1B de cada una de las diferentes mezclas lipídicas estudiadas. En la figura 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 resultados obtenidos se representaron en función de la concentración de lípido total accesible para el dominio C1 teniendo en cuenta que sólo la capa externa de la vesícula fosfolipídica es la que puede interactuar con la proteína (~57%). Los datos resultantes de transferencia de energía de la proteína a la membrana se calcularon como se explicó ampliamente en el Capítulo II de la presente Memoria y se representaron frente a la concentración de lípido total disponible. Los valores medios de tres experimentos independientes se ajustaron mediante el modelo teórico de Hill.

Al comparar los tres dominios, en relación a su capacidad de enlazarse a membranas lipídicas, veremos que destaca mucho la notablemente mayor afinidad por estas membranas del C1B ϵ con respecto a los otros dos dominios estudiados.

En primer lugar se estudió la capacidad de unión a membranas compuestas por 40 moles % de lípido negativo: POPS, POPA o POPG y en ausencia de DAGs. La [Figura V.2.](#) muestra la correlación entre el aumento de fluorescencia conforme aumenta la concentración de lípido para las isoenzimas C1B γ ([Figura V.2A](#)), C1B δ ([Figura V.2B](#)) y C1B ϵ ([Figura V.2C](#)).

En la [Figura V.3.](#) y [Tabla V.1.](#) se muestran las constantes aparentes de disociación (K_D) en presencia de cada uno de los fosfolípidos aniónicos utilizados. En el caso de C1B γ los valores de K_D para membranas que contenían POPS, POPA y POPG fueron respectivamente 65,6, 5,8 y 52,7 μM

Por su parte C1B ϵ presentó valores de K_D para POPS, POPA y POPG de 17,1, 3,2 y 4,4 μM , respectivamente.

Finalmente, C1B δ mostró unos valores de K_D para POPS, POPA y POPG de 77, 45,7 y 491 μM , respectivamente.

Se puede resaltar como más sobresaliente, dentro de este apartado, la gran capacidad de enlace de C1B ϵ en presencia de cualquiera de los tres fosfolípidos, la muy baja de C1B δ en presencia de POPG y la gran preferencia de C1B γ por POPA. De los tres fosfolípidos, POPA resultó ser el que mejor estimula la translocación de los dominios a la membrana.

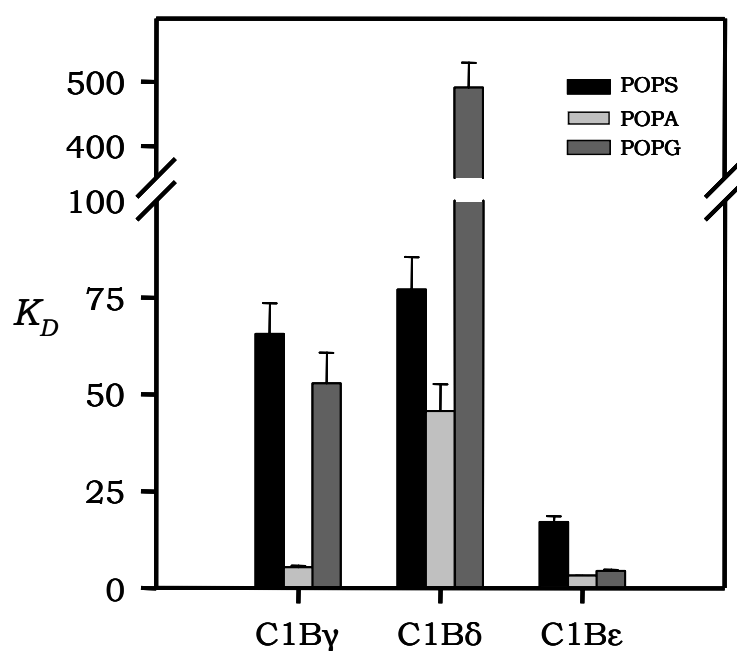


Figura V.3. Representación en diagrama de barras de las constantes aparentes de disociación obtenidas para cada uno de los dominios C1B estudiados en presencia de los diferentes tipos de lípidos negativos.

Tabla V.1. Constantes aparentes de disociación de los dominios C1B con 40 moles% de lípido negativo: POPS, POPA y POPG.

		POPS	POPA	POPG
C1B γ	K_D	65,6±8	5,8±0,5	52,8±7,9
C1B δ	K_D	76,9±9	45,7±7	491±39
C1B ϵ	K_D	17,1±2	3,2±0,1	4,4±0,3

También se estudió la capacidad de unión a membranas que contenían diferentes fosfolípidos aniónicos en presencia de 5 moles % de DOG (1,2-*sn*-dioleilglicerol), como se puede observar en las Figuras V.4 y V.5. Al incorporar DOG al 5%, de nuevo se confirma que el dominio C1B ϵ es el que tiene una mayor afinidad por las membranas, tanto si contienen POPS como POPA. En cambio se puede observar que el C1B α apenas tiene capacidad para enlazarse a estas membranas (Figuras V.4A y V.5A).

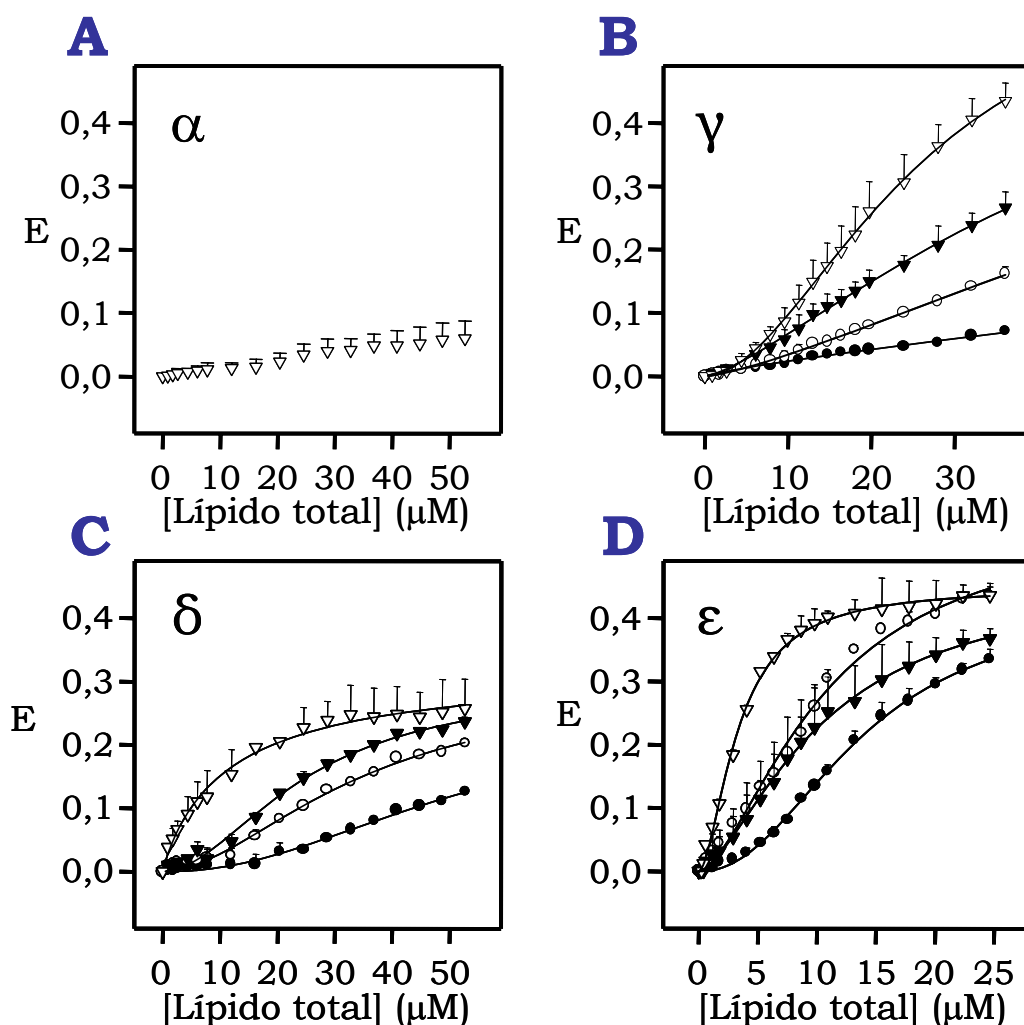


Figura V.4. Unión del dominio C1B-CFP a 1,2-*sn*-dioleilglicerol (DOG) en función de la concentración de lípido negativo POPS. Se llevaron a cabo las valoraciones de unión de los dominios C1B-CFP de las isoenzimas clásicas α (A) y γ (B) y de las isoenzimas nuevas δ (C) y ϵ (D) en presencia de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/POPS/DOG/OG-dPE donde se incluyó un 5% de DOG, un 5% de OG-dPE y concentraciones crecientes de POPS: 5% (●), 10% (○), 20% (▼) y 40% (▽). Para todos los casos el tampón utilizado fue: Hepes 20 mM (pH 7,4) y KCl 100 mM. En la figura se muestran los valores medios con su desviación estándar de las constantes de disociación aparentes obtenidas a partir de tres experimentos independientes mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Hill. Los experimentos se realizaron de forma similar a la comentada en la Figura V.2.

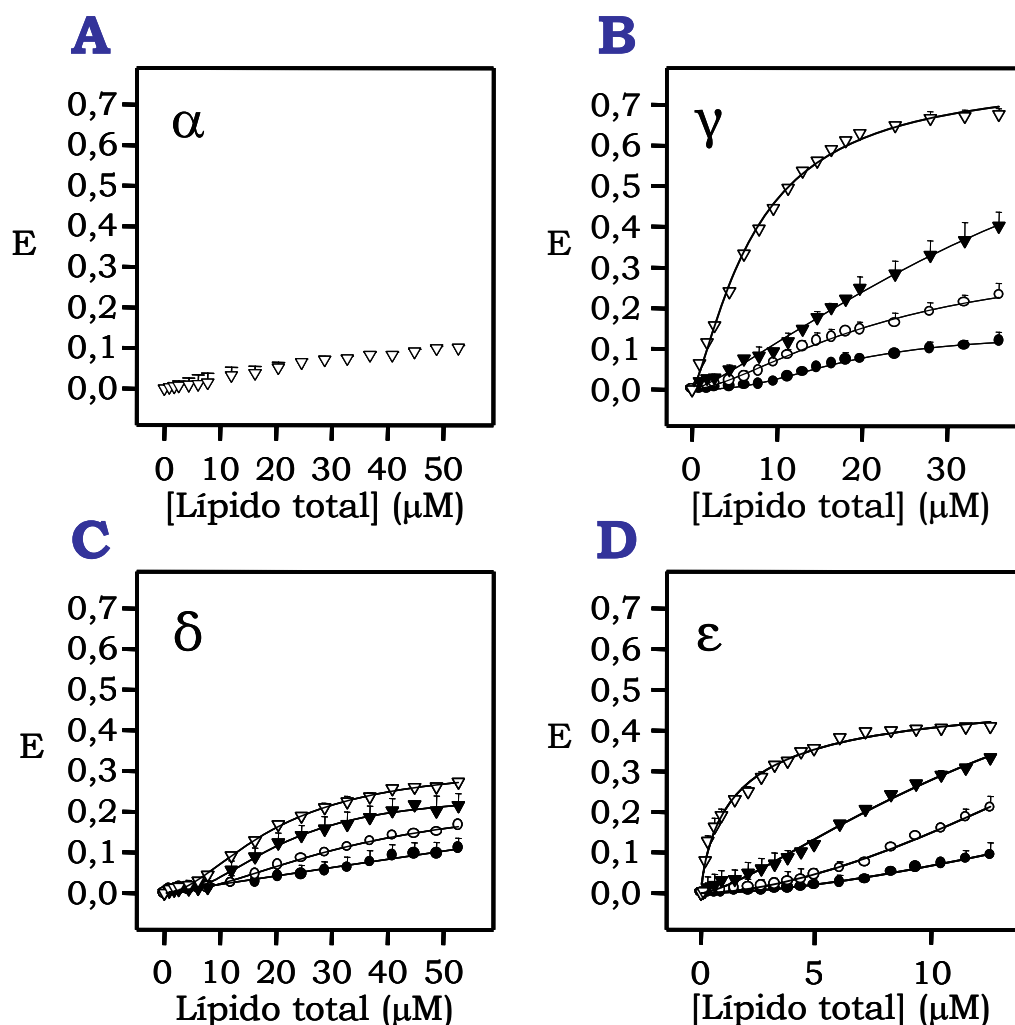


Figura V.5. Unión de los dominios C1B-CFP a 1,2-*sn*-dioleilglicerol (DOG) en función de la concentración de lípido negativo POPA. Se llevaron a cabo las valoraciones de unión de los dominios C1B-CFP de las isoenzimas clásicas α (A) y γ (B) y de las isoenzimas nuevas δ (C) y ε (D) en presencia de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/POPA/DOG/OG-dPE donde se incluyó un 5% de DOG, un 5% de la molécula aceptora de fluorescencia, oregon green DHPE y concentraciones crecientes de POPA: 5% (●), 10% (○), 20% (▼) y 40% (∇). Para todos los casos, el tampón utilizado fue: Hepes 20 mM (pH 7,4) y KCl 100 mM. En la figura se muestran los valores medios con su desviación estándar de las constantes de disociación aparentes obtenidas a partir de tres experimentos independientes mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Hill. Los experimentos se realizaron de forma similar a la comentada en la Figura V.2.

En la **Figura V.6.** se muestran los valores de las constantes aparentes de disociación (K_D) calculadas a partir de las curvas obtenidas tras tres experimentos independientes para cada una de las mezclas lipídicas y para cada uno de los dominios. Estos valores se representan frente a los porcentajes de fosfolípidos aniónicos en la membrana.

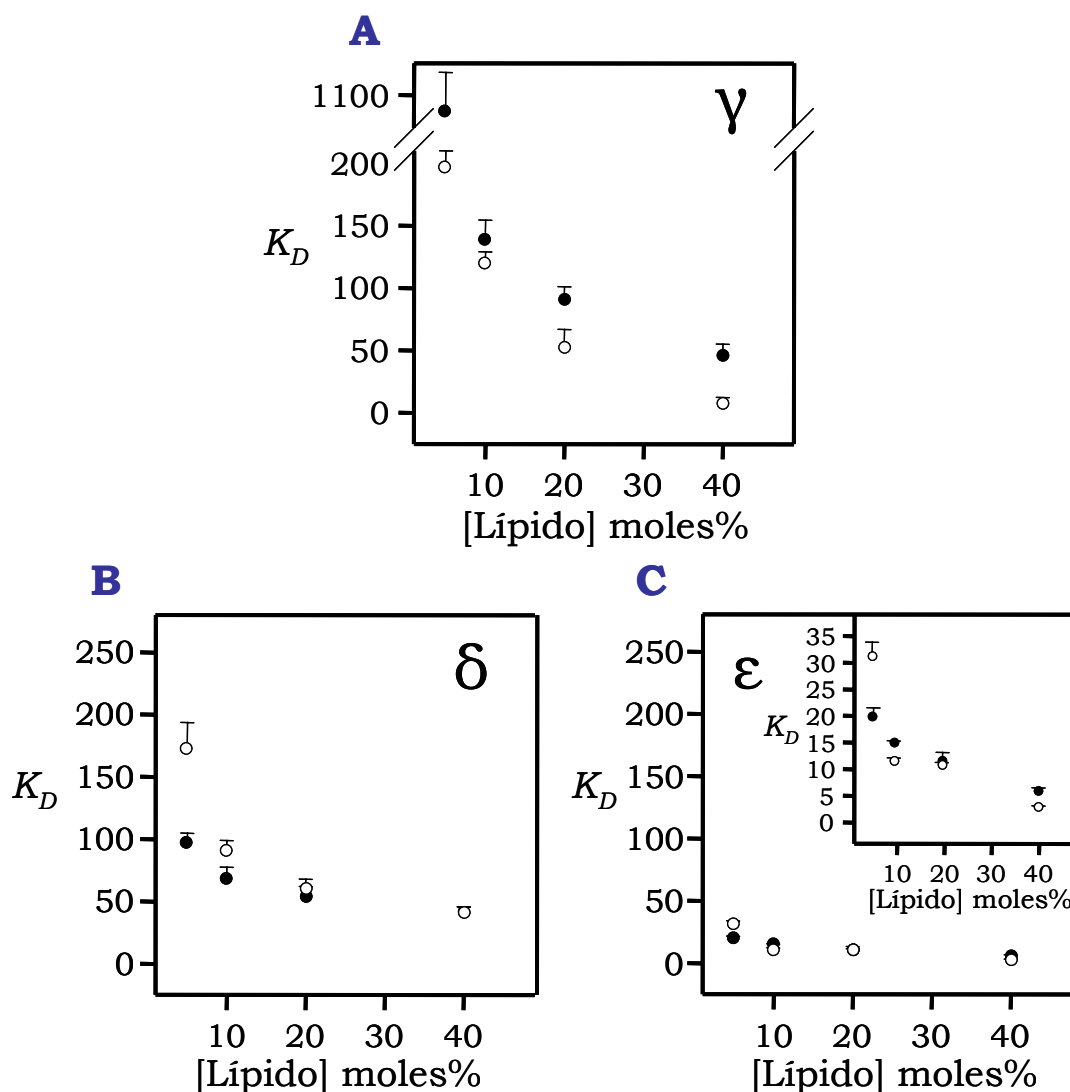


Figura V.6. Unión de los dominios C1B-CFP a 1,2-*sn*-dioleilglicerol (DOG) en función de la concentración de lípido negativo. Se llevaron a cabo las valoraciones de unión de los dominios C1B-CFP de las isoenzimas γ (A), δ (B) y ϵ (C) en presencia de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/fosfolípido/DOG/OG-dPE donde se incluyó un 5% de DOG, un 5% de la molécula aceptora de fluorescencia OG-dPE y concentraciones crecientes de fosfolípido POPS (●) o POPA (○): 5%, 10%, 20% y 40%. Para todos los casos, el tampón utilizado fue: Hepes 20 mM (pH 7,4) y KCl 100 mM. En la figura se muestran los valores medios con su desviación estándar de las constantes de disociación aparentes obtenidas a partir de tres experimentos independientes mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Hill. Los experimentos se realizaron de forma similar a la comentada en la [Figura V.2](#).

En estas condiciones, el dominio C1B γ ([Figura V.6A](#)) presentó una mayor afinidad por POPA que por POPS, especialmente a bajas concentraciones de fosfolípido aniónico. Así, en presencia de 5 moles % de POPS presentó una K_D de 1077 μ M mientras que para POPA la K_D fue 197 μ M. Asimismo, cuando la concentración de lípido negativo

aumentó a 40 moles % las K_D fueron de 46 μM y 7 μM para POPS y POPA respectivamente. Estos resultados indican que a esta concentración de DOG, este dominio tiene una afinidad más de 6 mayor por POPA cuando el fosfolípido aniónico está a 40 moles % (Figuras V.4B y V.5B).

Diferente fue el caso del dominio C1B δ que en presencia de 5 moles % de fosfolípido aniónico presentó mayor afinidad por POPS, siendo el valor de K_D : 98 μM frente a POPA cuyo valor de K_D de 172 μM . Además, cuando se aumentaron las concentraciones de POPS y POPA a 40 moles % se obtuvieron unos valores de afinidad muy similares para ambos lípidos, siendo la K_D : 42 μM (Figuras V.4C, V.5C y V.6B).

En las mismas condiciones experimentales se estudió el dominio C1B ϵ (Figura V.6C). En presencia de 5 moles % de lípido negativo, los valores de K_D fueron de 20 μM y 31 μM para POPS y POPA respectivamente (inserto en Figura V.6C) mientras que cuando la concentración aumentó a 40 moles % la afinidad fue mayor en presencia de POPA, con K_D de 5,5 y 2,6 μM respectivamente para POPS y POPA (Figuras V.4D y V.5D). Por tanto, si comparamos la capacidad de unión que presentan estos tres dominios a membranas que contienen fosfolípidos aniónicos, el dominio C1B ϵ es el que presenta mayor afinidad por membranas que contienen 5 moles % DOG en presencia de fosfolípidos cargados negativamente ya que, por ejemplo, a 40 moles % de POPS es 8 veces mayor que la de C1B δ y 9 veces la de la C1B γ , y en presencia de 40 moles % de POPA es 16 veces mayor que la del C1B δ y 3 veces mayor que la del C1B γ .

Es destacable que la gran preferencia respecto a POPA mostrada en ausencia de diacilgliceroles, sobre todo por C1B γ y C1B ϵ , queda atenuada cuando se añade DOG, quedando más próximas las capacidades de translocar proteína a la membrana por POPA y POPS. Así por ejemplo, el C1B ϵ a 40 moles % de fosfolípidos aniónicos, presentó 6 veces más afinidad por POPA que por POPS en ausencia de DAG, pero sólo 2 veces más en presencia de 5 moles % de DOG.

También se estudió la capacidad de unión de estos dominios cuando se aumentó la concentración de DAGs a 15 moles %, y manteniendo la concentración de 40 moles % de fosfolípidos aniónicos (Tabla V.2).

Tabla V.2. Constantes aparentes de disociación (K_D) de los dominios C1B con membranas que contenían 15 moles % de DAG y en presencia de 40 moles % de distintos lípidos negativos.

		15% DOG			15% SAG			15% DPG		
		40 % POPS	40 % POPA	40 % POPG	40 % POPS	40 % POPA	40 % POPG	40 % POPS	40 % POPA	40 % POPG
C1B γ	K_D	9,8	7,2	21,3	23,1	4,3	19,9	42,9	15,8	49,9
C1B δ	K_D	4,9	9,4	6,0	17,7	29,4	8,4	58,7	111,9	32,1
C1B ϵ	K_D	1,8	0,1	1,1	6,8	0,2	2,4	11,2	4,2	5,4

En presencia de 15 moles % de DOG (Tabla V.2) y 40 moles % de POPS, POPA o POPG, de nuevo, el dominio que presentó mayor capacidad de unión para los tres fosfolípidos estudiados fue el dominio C1B ϵ independientemente de la combinación de fosfolípido aniónico y diacilglicerol utilizada, y de los tres fosfolípidos aniónicos, el POPA fue con el que presentó una mayor capacidad de unión. Así, en presencia de POPA se obtuvo una afinidad casi 20 veces mayor que en presencia de POPS (K_D de 0,1 y 1,8 μ M, respectivamente) y 10 veces mayor que en presencia de POPG (1,1 μ M). Con estos resultados, es de destacar la baja afinidad que presenta el dominio C1B ϵ por POPS, aunque este fosfolípido se ha considerado siempre como el activador principal de las PKCs clásicas y nuevas, tanto a través de sus dominio C2 como de los C1. En cambio, el dominio C1B γ , presentó afinidades similares por POPS y POPA mientras que con POPG presentó menor afinidad. Sin embargo, no se apreciaron diferencias tan significativas para el caso del dominio C1B δ en presencia de los tres fosfolípidos aniónicos, aunque la afinidad fue algo mayor por POPS (K_D de 4,9 μ M) que por POPG (6 μ M) o por POPA (9,4 μ M) (Tabla V.2).

Del mismo modo, se estudió la afinidad de unión de los dominios C1B γ , C1B δ y C1B ϵ , en presencia de 15 moles % de otro DAG como es el SAG (Tabla V.2). El dominio que mayor afinidad exhibió fue de nuevo el C1B ϵ en presencia de POPA (K_D : 0,2 μ M) mientras que esta afinidad disminuyó del orden de 30 veces en presencia de POPS (6,8 μ M) y de 10 veces cuando se utilizó POPG (2,4 μ M). Del mismo modo, el dominio C1B γ mostró mayor afinidad por

POPA que fue casi 5 veces mayor que con POPG (K_D de 4,2 y 20 μM , respectivamente) y casi 6 veces con respecto a POPS (23 μM). En cambio, el dominio C1B δ presentó mayor afinidad por POPG (K_D : 8,4 μM), siendo esta el doble que para POPS (K_D : 17,7 μM) y 3,5 veces con respecto a POPA (K_D : 29,4 μM).

También se estudió la afinidad de unión de estos dominios en presencia de 15 moles % de un DAG saturado como el 1,2-dipalmitil-*sn*-glicerol (DPG) (Tabla V.2). En comparación con los DAGs insaturados anteriormente comentados, las afinidades de unión para DPG fueron mucho más bajas. El dominio que presentó valores de afinidad más elevados fue el dominio C1B ϵ . Esta afinidad fue diferente en función del lípido negativo utilizado, de modo que en presencia de POPA y POPG las K_D fueron de 4,2 μM y 5,3 μM respectivamente, mientras que para POPS la afinidad fue ligeramente menor (K_D : 11,2 μM). En cambio, el dominio C1B γ mostró preferencias similares a las observadas para SAG, presentando mayor afinidad en presencia de POPA (K_D : 15,8 μM) frente a POPS (K_D : 42,9 μM) y POPG (K_D : 49,9 μM). Por último, el dominio C1B δ , de nuevo como con SAG, mostró mayor afinidad en presencia de POPG (K_D : 32,1 μM) y menor en presencia de POPS (K_D : 58,7 μM) siendo con POPA con el que presentó menor afinidad (K_D : 111,9 μM). Es de destacar la menor afinidad presentada por los tres dominios con respecto a DPG en relación a los insaturados como DOG y SAG, lo que estaría de acuerdo con observaciones anteriores de la actividad de PKC (Torrecillas y col., 2001), e indicando que los tres dominios pueden unirse con mayor afinidad a los insaturados. Al comparar las afinidades por DOG y por SAG se observó que tanto en los casos de C1B δ como C1B γ mostraron más afinidad por DOG, en presencia de cualquiera de los tres fosfolípidos aniónicos, con entre el doble o el triple de más afinidad. Sin embargo el C1B γ mostró algo más del doble de afinidad por DOG pero el doble de más afinidad por SAG en presencia de POPA y similares afinidades para ambos DAGs en presencia de POPG (Tabla V.2).

Queda claro, por tanto, que el C1B ϵ mostró una preferencia elevada por POPA, y con este fosfolípido sus K_D fueron las más bajas, seguido por POPG, y con una menor afinidad por POPS. En el caso del C1B γ , también la preferencia, con los tres diacilgliceroles, es por POPA, aunque en presencia de DOG, la preferencia no es tan clara, con relación a POPS. Por otra parte, con el C1B δ curiosamente se dan unas diferentes preferencias, y en presencia de SAG y DPG el

fosfolípido que da lugar a menores K_D es POPG, y en el caso de DOG, POPS y POPG son los preferidos, dando resultados similares.

En estudios previos sobre la preferencia de los dominios C1 con relación a fosfolípidos aniónicos, se obtuvieron resultados diversos y contradictorios. Esto es en parte porque se ha tratado, en algunos casos, de obtener conclusiones utilizando PKCs completas y esto es problemático por la presencia del C2 que también se une a lípidos aniónicos. Por ello, y si buscamos exclusivamente dominios C1 aislados, veremos que se han realizado realmente pocos estudios sistemáticos. Podemos mencionar que en un estudio sobre C1B β , se concluyó que este dominio enlaza PS con una mayor afinidad (tasada en un orden de magnitud) que otros fosfolípidos aniónicos como PG (Johnson et al., 2000). Sin embargo, en otro estudio utilizando el C1B α se concluyó que no distingue entre PS y PG (Medkova y Cho, 1999). Ningún estudio de este tipo se ha llevado a cabo con las isoenzimas nuevas.

Es de destacar, en nuestro estudio que las K_D más altas aparecen siempre con DPG, cuando se comparan los datos con los de DOG y SAG, y ello es debido, probablemente, a efectos sobre la membrana, ya que debido a la saturación de las cadenas acílicas de este diacilglicerol, las membranas pasan a estar en estado gel (Torrecillas y col., 2001).

Posteriormente, se estudiaron en mayor detalle los tres DAGs anteriormente comentados, primero en presencia de 40 moles % de POPS (Figura V.7) posteriormente, en presencia de 40 moles % de POPA (Figura V.8).

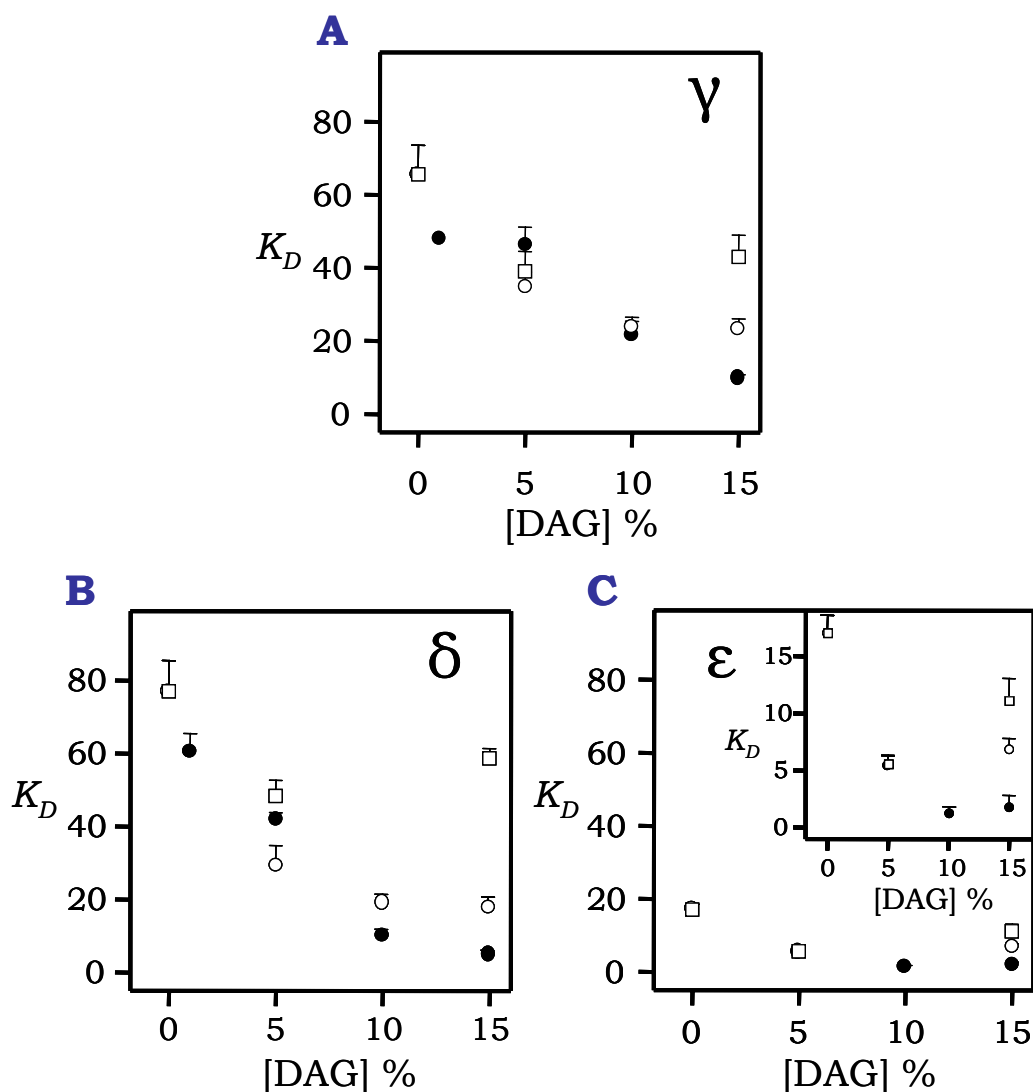


Figura V.7. Unión de los dominios C1B-CFP a membranas que contenían 40 moles % POPS, en función de la concentración de DAG. Se llevaron a cabo las valoraciones de unión de los dominios C1B-CFP de las isoenzimas γ (A), δ (B) y ϵ (C) en presencia de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/POPS/DAG/OG-dPE donde se incluyó 40 moles % de POPS, un 5% de la molécula aceptora de fluorescencia OG-dPE y concentraciones crecientes de DAG: DOG (●), SAG (○) o DPG (□): 0%, 1%, 5%, 10% y 15%. Para todos los casos, el tampón utilizado fue: Hepes 20 mM (pH 7,4) y KCl 100 mM. En la figura se muestran los valores medios con su desviación estándar de las constantes de disociación aparentes obtenidas a partir de tres experimentos independientes mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Hill. Los experimentos se realizaron de forma similar a la comentada en la [Figura V.2](#).

Así, en presencia de 40 moles % de POPS ([Figura V.7](#)) y para el caso del dominio C1B γ ([Figura V.7A](#)) se observaron afinidades similares, así por ejemplo, con 5 moles % de DAGs, los valores de K_D fueron de 46,1 μ M, 34,9 μ M y 39 μ M para DOG, SAG y DPG respectivamente. Sin embargo, con 15 moles % de DAGs, los valores

de K_D fueron 9,8 μM , 23,1 μM y 43 μM para DOG, SAG y DPG respectivamente. Este valor más elevado en el caso del DPG puede ser debido a un proceso de rigidificación de la membrana debido a que en estas condiciones experimentales, ésta se encuentra en fase de gel. Para el caso de las otras isoenzimas, C1B δ y C1B ϵ , se observó un patrón similar en presencia de POPS con unos valores de K_D similares para cualquiera de los tres DAGs estudiados. Como ocurrió en el dominio C1B γ , cuando se compararon los tres DAGs sólo se observaron diferencias en presencia de 15 moles % de DPG en cuyo caso se produjo una disminución considerable de la afinidad. En cualquier caso, es de destacar la elevada afinidad que presenta el dominio C1B ϵ por membranas que contienen POPS en comparación con los otros dominios, siendo los valores de K_D con 5 moles % de DOG o DPG de 5,5 μM o 5,6 μM respectivamente (Figura V.7C).

La conclusión es, por tanto, que el C1B ϵ siguió mostrando aquí la mayor afinidad por las membranas, independientemente del diacilglicerol utilizado. Por otra parte, excepto para la concentración de 15 moles % de DPG que, como se mencionó antes, dio siempre K_D más altas, debido probablemente a efectos de membrana.

Estos tres DAGs también se estudiaron en presencia de 40 moles % de POPA (Figura V.8). En el caso de los dominios C1B γ y C1B δ , se observaron unas afinidades más elevadas que las observadas con 40 moles % POPS (Figuras V.8A y V.8B) e incluso fueron también más elevadas para el dominio C1B ϵ (Figura V.8C). Así, en el caso del dominio C1B γ (Figura V.8A) se observaron unas afinidades de unión muy elevadas para cualquiera de los DAGs estudiados, así p.e. con 5 moles % de DOG se obtuvo un valor de K_D de 7,3 μM . La afinidad de este isoenzima por vesículas que contienen POPA fue claramente más elevada que por vesículas que contenían los mismos DAGs pero en presencia de POPS. En el caso del dominio C1B δ , las afinidades fueron muy similares a las obtenidas en presencia de POPS no observándose diferencias significativas con los tres DAGs, excepto en el caso de 15 moles % de DPG, en cuyo caso la afinidad descendió considerablemente con un valor de K_D de 111,9 μM frente a un valor de K_D de 9,4 μM en presencia de 15 moles % de DOG. Sin embargo, el dominio C1B ϵ , en presencia de 40 moles % de POPA y bajas concentraciones de DAGs o en su ausencia total, presentó un ligero incremento en la afinidad en presencia de SAG con respecto a los otros DAGs estudiados, siendo las constantes

aparentes de disociación para 5 moles % de DAG de 2,6, 0,9 y 2,2 μM para DOG, SAG y DPG respectivamente (inserto en Figura V.8C).

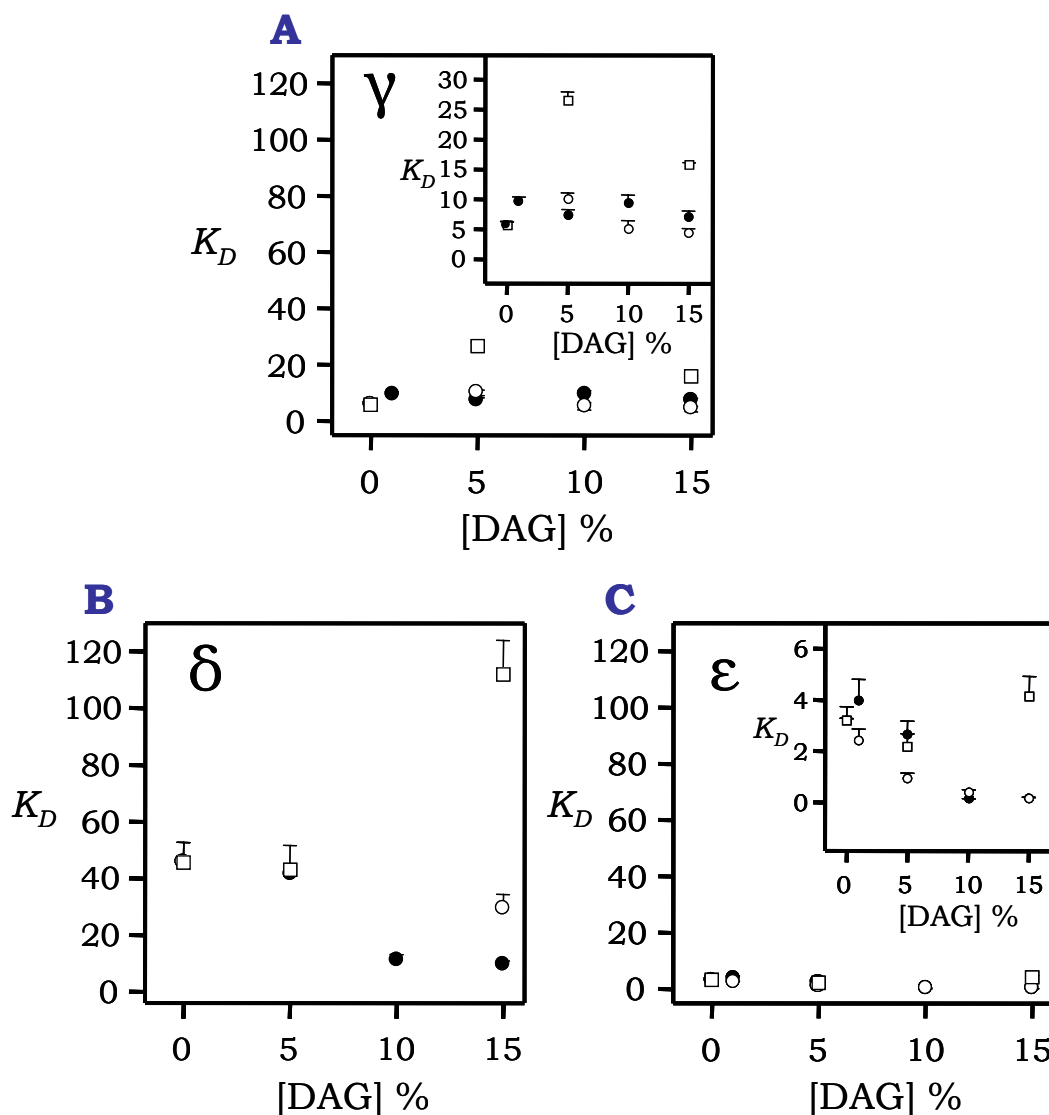


Figura V.8. Unión de los dominios C1B-CFP a 40 moles % POPA en función de la concentración de DAG. Se llevaron a cabo las valoraciones de unión de los dominios C1B-CFP de las isoenzimas γ (A), δ (B) y ϵ (C) en presencia de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) compuestas por POPC/POPA/DAG/OG-dPE donde se incluyó 40 moles % de POPA, 5 moles % de la molécula aceptora de fluorescencia OG-dPE y concentraciones crecientes de DAG: DOG (\bullet), SAG (\circ) o DPG (\square): 0%, 1%, 5%, 10% y 15%. Para todos los casos, el tampón utilizado fue: Hepes 20 mM (pH 7,4) y KCl 100 mM. En la figura se muestran los valores medios con su desviación estándar de las constantes de disociación aparentes obtenidas a partir de tres experimentos independientes mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Hill. Los experimentos se realizaron de forma similar a la comentada en la Figura V.2.

En un reciente artículo en el que se analizaron comparativamente la afinidad de C1B δ y C1B ϵ por membranas que contenían POPS y DOG, utilizando el método de resonancia de plasmones de superficie (SPR) también se concluyó que el dominio C1B ϵ tiene bastante más capacidad de enlazarse a este tipo de membranas que el dominio C1B δ (Stahelin y col., 2005). Por otra parte, se observó previamente que el dominio C1B γ tiene una capacidad de enlace, en presencia también de DOG, comparable a la del dominio C1B ϵ (Ananharayan y col., 2003).

En resumen, se puede concluir que de los tres dominios estudiados aquí, el C1B ϵ es el que tiene una mayor tendencia a unirse a membranas con lípidos aniónicos, y ello incluso en ausencia de diacilglicerol. Por otra parte, tanto el C1B ϵ como el C1B γ , a concentraciones altas de diacilglicerol, se enlazan con gran afinidad a membranas que contengan POPA, con preferencia a POPG o POPS, mientras que el C1B δ tiene una mayor preferencia por POPG en presencia de SAG y DPG. Ninguno de los tres dominios muestra una clara preferencia por un DAG dado, excepto cuando el DPG se usó a 15 moles %, puesto que entonces bajó claramente la afinidad, posiblemente debido a efectos de membrana.

Se deriva pues de este estudio, que de los tres dominios estudiados el de la epsilon es probablemente el que mayor trascendencia tiene a la hora de facilitar la translocación a membrana de enzima, y por tanto su activación, tanto en presencia como en ausencia de DAGs. Además, esta capacidad vendría acompañada por la también elevada afinidad del C1A ϵ por DAG (Stahelin et al., 2004). Los otros dos dominios C1B estudiados pueden no ser tan importantes para la activación de sus respectivos enzimas. El de la gamma porque también el C1A tiene afinidad comparable por DAG (Ananthanarayanan y col., 2003) y además porque en las PKC clásicas el dominio C2 juega un papel muy importante en la activación. En el caso de la PKC δ parece ser que el dominio con bastante mayor afinidad por DAG es el C1A (Stahelin y col., 2004). En un trabajo anterior se observó que el C1B θ (de las PKC nuevas) mostró mucha mayor afinidad por SAG que por DOG y eso se interpretó que podría conferir a esta PKC una mayor afinidad por membrana plasmática (más rica en SAG) que por membranas internas (más ricas en DOG) como el Golgi (Carrasco y Mérida, 2004). En los dominios estudiados en este trabajo las diferencias apreciadas

podrían también significar una preferencia de unión de los C1B δ y C1B ϵ a membranas internas como el Golgi, con una mayor preferencia por membrana plasmática en el caso del C1B γ teniendo en cuenta además que precisamente este dominio tiene preferencia por SAG en presencia de POPS que es un fosfolípido que se encuentra en la membrana plasmática (van Meer, 1998).

1. RESUMEN.

Se estudió la estructura secundaria del dominio catalítico de la PKC ζ (Cat- ζ) utilizando espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) y se analizó su estabilidad frente a la desnaturalización térmica así como el posible efecto protector del ATP. En ausencia de Mg²⁺-ATP y a 25 °C, la PKC ζ mostró como componente principal la hélice α , con el 27% del total. Otros componentes asignados como la hélice 3₁₀ y bucles asociados supusieron un 18%, mientras que los componentes de hoja β y bucles grandes abiertos supusieron un 17% y un 16% del total respectivamente. Además se utilizó el sustrato Mg²⁺-ATP para estudiar los efectos que produce sobre la estructura secundaria de la PKC ζ así como su influencia en la desnaturalización térmica. Se observó un aumento de los componentes de bucles grandes abiertos y hoja β , de un 7 y 6% respectivamente, en detrimento de los componentes hélice 3₁₀ y bucles asociados y hélice α que experimentaron un descenso de un 7% y un 4% respectivamente. Los mayores cambios se produjeron cuando la proteína se sometió a calentamiento a 80 °C en ausencia y presencia de Mg²⁺-ATP. Así, en ausencia de Mg²⁺-ATP y después de calentar a 80 °C, se observaron descensos del 14% en la hélice α y del 6% en la hoja β mientras que no se observó cambio alguno en los componentes bucles grandes abiertos ni en el componente hélice 3₁₀ y bucles asociados. El máximo incremento se observó en el componente hoja β agregada que fue de un 14 %. En presencia de Mg²⁺-ATP, y en comparación con la muestra desnaturalizada en ausencia de este sustrato, se produjo un descenso del componente hélice 3₁₀ y bucles asociados de un 5%. Sin embargo la PKC ζ mostró una mayor protección frente a la desnaturalización térmica en presencia de Mg²⁺-ATP con un mantenimiento de un mayor porcentaje de hélice α , es decir, tan sólo se observó un descenso del 5% frente al 14% en ausencia de Mg²⁺-ATP.

Por otra parte, también se llevó a cabo un estudio de correlación bidimensional para analizar con mayor detalle las diferencias existentes entre el dominio Cat- ζ durante el proceso de desnaturalización térmica en ausencia y en presencia de Mg²⁺-ATP. 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 (1617 cm⁻¹). Este incremento fue directamente proporcional con el cambio en el componente hélice α . En presencia de Mg²⁺-ATP la principal correlación se encontró entre la hoja β agregada y el componente de bucles grandes abiertos. Además,

la correlación bidimensional asíncrona nos permitió establecer el orden secuencial del proceso en estudio, de manera que el aumento en la agregación de la proteína desnaturalizada se debió a la disminución de los componentes hélice α y hoja β . Además, es de destacar que los cambios en los componentes hélice 3_{10} y bucles asociados y en la hélice α tuvieron lugar antes que en el componente de bucles grandes abiertos, lo cual sugiere que la estructura de bucles abiertos actúa como un estado intermedio durante la desnaturalización.

2. INTRODUCCIÓN.

La subfamilia de las isoenzimas atípicas de la PKC (ζ , ι/λ) se caracterizan por presentar una región reguladora en el extremo amino terminal y una región catalítica en el extremo carboxilo terminal. La región reguladora es claramente distinta al resto de subfamilias de la PKC (clásicas y nuevas). Así, en dicha región se distinguen 3 dominios funcionales donde además de la región pseudosustrato y el dominio PB1, existe un dominio C1 denominado “atípico” porque posee un solo motivo “en dedos de zinc”. Otra característica diferencial con respecto al resto es que no posee dominio C2. De esta manera, se caracterizan por no estar reguladas por DAG ni por calcio (Mellor y Parker, 1998; Newton, 2001) a diferencia del resto de isoenzimas. Sin embargo, sí son activadas directa o indirectamente por otros ligandos como fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) (Nakanishi y col., 1993; Standaert y col., 2001), ácido fosfatídico (Limatola y col., 1994) y otros lípidos como ceramidas y ácido araquidónico (Muller y col., 1995).

Sin embargo, la región catalítica es relativamente similar al resto de isoenzimas de la PKC. El dominio quinasa de las PKC atípicas, así como otros miembros de la familia AGC, incluye una región de unión a Mg²⁺-ATP, que contiene un residuo de lisina, Lys281, que es crucial para la actividad quinasa. Además, se distingue un bucle de activación, un motivo de giro y un motivo hidrofóbico que son fosforilados en residuos específicos para conseguir el estado catalíticamente competente y por tanto activo de la PKC (véase apartado 1.4.1. del Capítulo I de la presente Memoria). Mientras que las isoformas de las PKC clásicas y nuevas poseen 3 sitios de fosforilación localizados en el bucle de activación, en el motivo de giro y en el motivo hidrofóbico, la PKC ζ sólo tiene dos sitios de fosforilación en dos residuos de treonina: Thr410 (presente en el

bucle de activación) y Thr560 (localizado en el motivo de giro) los cuales se fosforilan y con ello activan a la PKC ζ (Chou y col., 1998; Le Good y col., 1998). Así, mientras que el residuo de Thr410 es fosforilado por la quinasa dependiente de fosfoinosítidos o PDK-1, parece ser que la fosforilación del residuo del motivo de giro, Thr560, ocurre por autofosforilación (Standaert y col., 2001).

Las PKC han demostrado jugar un papel esencial en un amplio rango de funciones celulares incluyendo señales que conducen a la mitogénesis, reordenación del citoesqueleto, metabolismo de la glucosa, diferenciación, regulación de la supervivencia y muerte celular (Selbie y col., 1993; Kampfner y col., 1998; Tabuse y col., 1998; Sanz y col., 1999). Es por ello por lo que las PKC se están utilizando cada vez más en pruebas clínicas para terapias de diversos tipos, p. e. los inhibidores de la PKC β se están utilizando en pruebas para el tratamiento de la retinopatía relacionada con la diabetes (Cohen, 2002).

En nuestro caso, la PKC ζ juega un papel muy importante en la supervivencia celular así como en el control del crecimiento celular (Berra y col., 1993; Bjorkoy y col., 1997; Wooten, 1999) estando implicada en multitud de vías de señalización intracelular que conllevan en último término a la transcripción de determinados genes que controlan estos procesos. Por ello, es una diana importante de actuación para la terapia contra el cáncer (Hofmann, 1994; Mackay y Twelves, 2003) y de ahí deriva el gran interés por estudiar la estructura del dominio catalítico de la PKC ζ y su interacción con sustratos.

Hasta este momento, no se ha resuelto la estructura completa de ninguna isoforma de la PKC, aunque sí se conoce la estructura de algunos de sus dominios aislados como es el caso de los dominios reguladores de algunas isoenzimas nuevas y clásicas. Recientemente, de forma paralela a la realización de este trabajo, se han resuelto las estructuras de los dominios catalíticos de tres isoenzimas de la PKC. En primer lugar, se resolvió el dominio catalítico de la PKC θ , perteneciente a la subfamilia de las PKC nuevas (Xu y col., 2004). Más tarde se resolvió el dominio catalítico de la PKC ι (Messerschmidt y col., 2005) miembro correspondiente a la subfamilia de las PKC atípicas junto con nuestra isoenzima de estudio. Y por último, el grupo de Grodsky y colaboradores (2006) ha resuelto el dominio

catalítico de la isoenzima clásica PKC β II. La estructura general presenta el pliegue bilobulado típico de las quinasas con los sitios de fosforilación, bucle de activación, motivo de giro y motivo hidrofóbico, bien definidos. Estos sitios se encuentran formando contactos iónicos intermoleculares, lo que contribuye a la estabilización de la conformación activa de la subunidad catalítica (para más detalle véase el apartado 1.4.1. del Capítulo I de la presente Memoria).

En este trabajo hemos estudiado mediante la técnica de espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) la estructura secundaria del dominio catalítico de la PKC ζ y cómo afecta la unión del sustrato Mg²⁺-ATP. También hemos analizado cómo influye en el proceso de desnaturalización térmica, la presencia o ausencia de dicho sustrato. Por último, hemos utilizado el análisis de correlación en dos dimensiones para ampliar información sobre la correlación entre los distintos elementos de la estructura secundaria durante el proceso de desnaturalización térmica. Los resultados mostraron un efecto importante del Mg²⁺-ATP sobre la estructura secundaria y sobre el proceso de desnaturalización térmica.

3. RESULTADOS.

3.1. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DEL DOMINIO Cat- ζ MEDIANTE FT-IR.

3.1.1. Estructura secundaria de Cat- ζ en ausencia de ligando a 25 °C: H₂O y D₂O.

La información obtenida de la estructura secundaria del dominio catalítico de la PKC ζ (Cat- ζ) se obtuvo mediante espectroscopía de infrarrojo. La descomposición de la banda amida I, localizada entre 1700 cm⁻¹ y 1600 cm⁻¹, es una banda conformacionalmente sensible y se puede utilizar bien en el seguimiento de una estructura secundaria determinada o bien en los cambios inducidos en la proteína por agentes externos (Arrondo y Goñi, 1999).

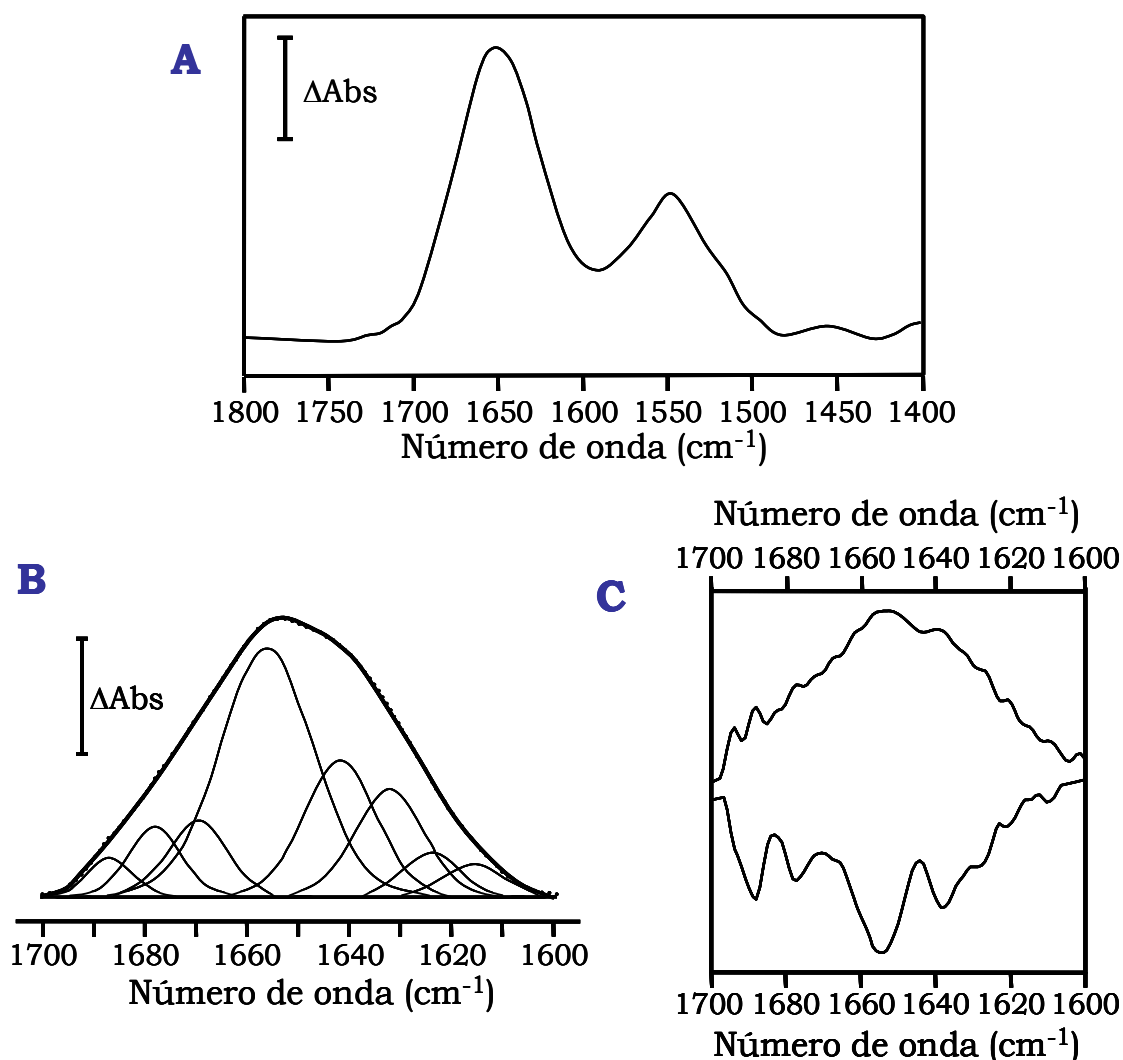


Figura VI.1. Espectros FT-IR del dominio catalítico de la PKC ζ a 25 °C en tampón en H $_2$ O en ausencia de Mg $^{2+}$ -ATP. Se muestra la región comprendida entre 1800-1500 cm $^{-1}$ donde se distinguen las bandas amida I y amida II resultantes de la sustracción del tampón correspondiente sin proteína (A). Espectro de FT-IR del dominio Cat- ζ en la región amida I a 25 °C y en tampón en H $_2$ O con las bandas componentes ajustadas (B). El tampón estaba compuesto por: Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), NaCl 200 mM, DTT 1 mM y 5 mM de MgCl $_2$. La concentración de proteína fue 20 mg·mL $^{-1}$ (421 μ M). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue 0,05. 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 desconvolución de Fourier (espectro superior en C) 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 C) de segundo grado se calculó con 7-13 cm $^{-1}$ de suavizado. Los parámetros correspondientes a estos componentes aparecen reflejados en la [Tabla VI.1](#). La línea discontinua representa la curva ajustada del espectro original. La obtención de los espectros y el tratamiento de los datos se detalla en el apartado 2.5.2.1 del Capítulo II de la presente Memoria.

La estructura del dominio Cat- ζ se determinó tanto en tampón en agua normal (H_2O) como en agua deuterada (D_2O), es por ello por lo que hablamos de banda amida I o amida I' respectivamente. El análisis de dicha banda se llevó a cabo tras la sustracción de los tampones correspondientes en ausencia de proteína (Figuras VI.1A y VI.2A). El número de componentes, así como su posición inicial se obtuvieron mediante la aplicación de la desconvolución y la derivación de los espectros (Figuras VI.1C y VI.2C). 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.) (para más detalle véase apartado 2.5.2.1. del Capítulo II de la presente Memoria). Los parámetros (posición y porcentaje de área total de cada una de los componentes espectrales, con su asignación estructural) resultantes de los ajustes del dominio catalítico Cat- ζ a 25 °C tanto en el tampón en H_2O como en D_2O se muestran en la Tabla VI.1.

En primer lugar, se estudió la estructura secundaria del dominio Cat- ζ en tampón en agua normal, en ausencia de Mg^{2+} -ATP y a 25° C ($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). La Figura VI.1A. muestra el espectro desde $1800\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ donde se exhiben las bandas amida I y II resultantes de sustraer el tampón correspondiente sin proteína. El espectro mostró 8 componentes en la banda amida I (región comprendida entre $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) (Figura VI.1B). El componente principal a 1657 cm^{-1} , con un 43% del total de la banda amida I, se puede asignar a hélice α aunque parte se puede atribuir a estructura desordenada (Arrondo y Goñi, 1999). Estos dos tipos de estructura, no se pueden diferenciar bien en un espectro en agua normal por lo que recurrimos, posteriormente, a realizar los espectros en tampón D_2O . El componente que aparece a 1631 cm^{-1} con un 14% se debe a las vibraciones intramoleculares C=O de las hojas β (Arrondo y Goñi, 1999). Los componentes de alta frecuencia que aparecen a 1672 cm^{-1} (9%), 1681 cm^{-1} (7%) y a 1691 cm^{-1} (3%) pueden proceder de giros β (Bandeekar y Krimm, 1980; Bandeekar, 1992) aunque los dos últimos también se pueden asignar a hoja β (Fabian y col., 1992; Arrondo y Goñi, 1999). Además un componente con un 19% de la estructura total localizado a 1641 cm^{-1} se puede asignar a bucles o hélice 3_{10} (Fabian y col., 1992). Sin embargo, teniendo en cuenta el espectro en tampón D_2O , como se muestra posteriormente, se asigna a los dos tipos de estructuras. La banda que aparece a 1622 cm^{-1} representa

un 5% y se atribuye a péptidos en una configuración extendida pero con un patrón de puentes de hidrógeno formados por residuos de péptidos que no forman parte de la hoja β intramolecular pero que sí que se encuentran formando puentes de hidrógeno con otras estructuras moleculares (Álvarez y col., 1987; Arrondo y col., 1988; Arrondo y Goñi, 1999). Sin embargo, cuando esta frecuencia se encuentra asociada a otro componente a 1693 cm^{-1} , tanto en tampón en agua como en D_2O , se atribuye a la estructura en horquilla β (Arrondo y col., 1996). Finalmente, en todos los casos estudiados se observa una banda adicional situada alrededor de 1612 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 del dominio catalítico de la PKC ζ .

En los espectros del dominio Cat- ζ obtenidos en presencia de tampón D_2O a $25\text{ }^\circ\text{C}$ ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura VI.2B) se puede observar que la banda amida II', la cual se encuentra centrada a 1560 cm^{-1} , descendió considerablemente como consecuencia del intercambio H-D que tiene lugar durante el uso del tampón D_2O obteniéndose para todos los casos un intercambio superior al 85% (Figura VI.2A) (Para más detalle véase apartado 2.5.2.2. del Capítulo II de esta Memoria).

La descomposición de la banda amida I' del dominio catalítico de la PKC ζ a $25\text{ }^\circ\text{C}$ y en tampón D_2O se muestra en la Figura VI.2. Los parámetros correspondientes a posición, porcentaje de área y asignación se muestran en la Tabla VI.1. El espectro en D_2O exhibió 9 componentes en la banda amida I' (Figura VI.2B). El componente mayoritario aparece a 1658 cm^{-1} y representa un 27% del total y se puede asignar a hélice α (Krimm y Bandekar, 1986; Fabian y col., 1992; Arrondo y col., 1994a; Arrondo y Goñi, 1999). Este componente se encuentra separado con respecto al espectro en agua normal, de otro componente que aparece a 1648 cm^{-1} (16%) y que se puede atribuir a bucles grandes abiertos que se encuentran completamente hidratados y que no interaccionan con grupos amida funcionales próximos (Fabian y col., 1992; Arrondo y Goñi, 1999). Los componentes de alta frecuencia a 1669 cm^{-1} (8%), 1679 cm^{-1} (6%) y 1689 cm^{-1} (1%) se pueden asignar a giros β y los dos últimos a giros β y parcialmente a hoja β (Fabian y col., 1992). Se predice que la intensidad en los componentes de alta frecuencia es menor que la

décima parte de las bandas de baja frecuencia, apareciendo un componente a 1631 cm^{-1} con una contribución del 17% (Fraser and MacRae, 1973). Los componentes de alta frecuencia se atribuyen a una estructura en hoja β antiparalela (Krimm y Bandekar, 1986; Arrondo y col., 1989), apareciendo a 1679 cm^{-1} y 1689 cm^{-1} en tampón en D_2O mientras que en tampón en agua normal aparecen a 1681 cm^{-1} y 1691 cm^{-1} . El componente que aparece a 1622 cm^{-1} con una frecuencia de un 7% no cambió durante el proceso de intercambio H-D lo cual es compatible con que se trate de una hoja β intermolecular o una estructura de horquilla β .

Tabla VI.1. Parámetros FT-IR de los componentes de la banda amida I del dominio catalítico de la PKC ζ en el tampón correspondiente, H_2O ($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) o D_2O ($5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) a $25\text{ }^\circ\text{C}$, en ausencia o presencia de Mg^{2+} -ATP.

Asignación	25 °C						80 °C			
	H_2O		D_2O		$\text{D}_2\text{O}+\text{MgATP}$		D_2O		$\text{D}_2\text{O}+\text{MgATP}$	
	posición ^a (cm^{-1})	área ^b (%)	posición (cm^{-1})	área (%)	posición (cm^{-1})	área (%)	posición (cm^{-1})	área (%)	posición (cm^{-1})	área (%)
Giros- β + hoja β	1691	3	1689	1	1688	1				
Giros- β + hoja β	1681	7	1679	6	1678	7	1680	8	1681	6
Giros- β	1672	9	1669	8	1669	7	1667	13	1673	6
Giros- β									1664	11
Hélice α	1657	43	1658	27	1659	23	1657	13	1655	18
Bucles abiertos			1648	16	1648	23	1649	16	1647	15
Hélice 3_{10} +bucles asoc.	1641	19	1640	18	1640	11	1640	18	1639	13
Hoja β	1631	14	1631	17	1631	23	1632	11	1632	10
Hoja β intermol.+ horquilla β	1622	5	1622	7	1621	5	1620	21	1621	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 $1610\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$ no se han tenido en cuenta.

Finalmente, el componente que aparece a 1641 cm^{-1} cambió su frecuencia máxima solamente 1 cm^{-1} con respecto al observado en el espectro en agua y esto corrobora el que se trate de una hélice 3_{10} o de bucles asociados poco accesibles al disolvente durante el proceso de intercambio con D_2O .

Es importante remarcar que para que la PKC ζ se encuentre en estado activo, el dominio catalítico debe estar fosforilado (ver revisión Hirai y Chida, 2003). En este trabajo hemos verificado que el dominio catalítico se encuentra fosforilado mediante la observación de la

banda que comprende el PO_2^- antisimétrico que aparece a una frecuencia 1244 cm^{-1} (Shimanouchi y col., 1964) en el espectro en agua y en ausencia de sustrato (datos no mostrados).

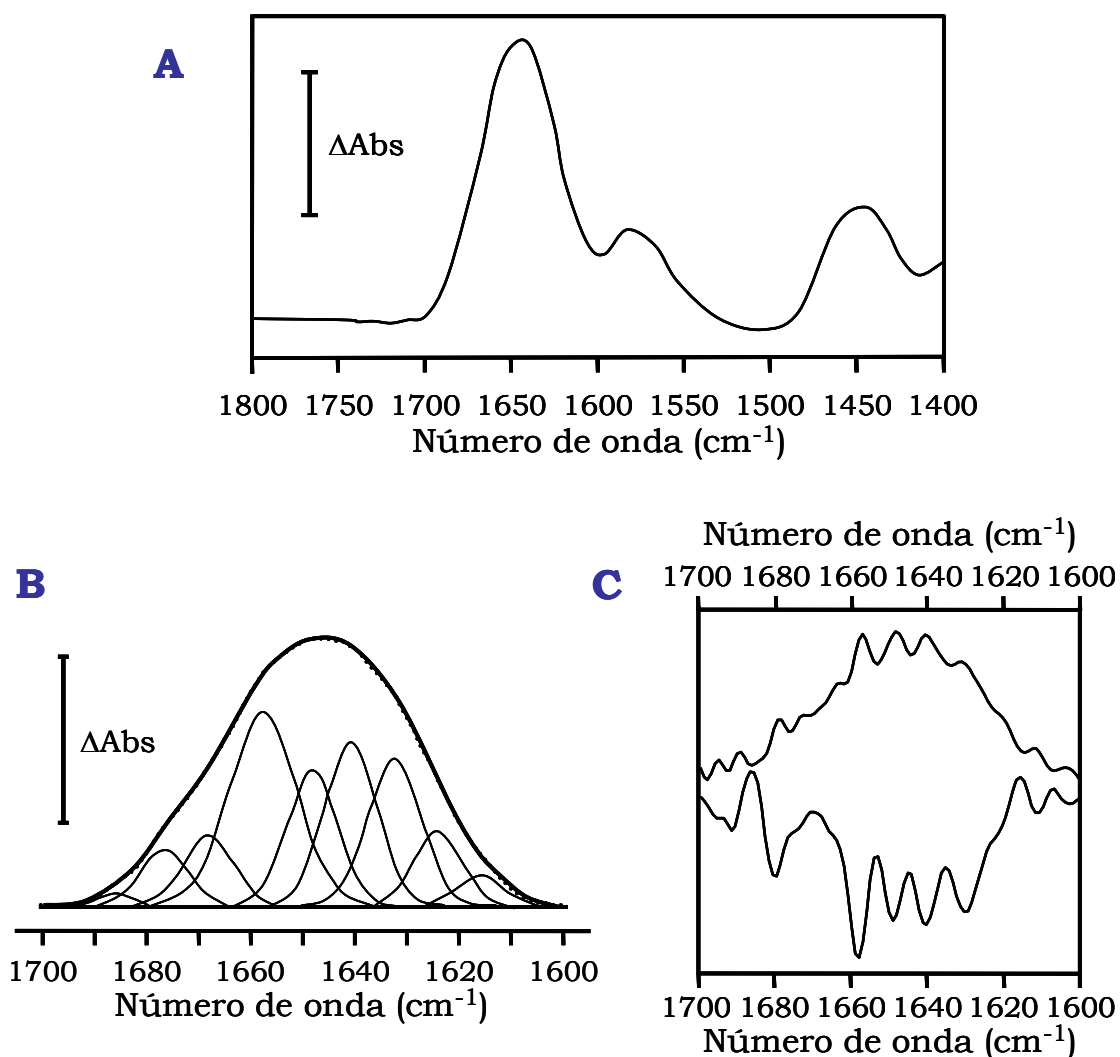


Figura VI.2. Espectro FT-IR del dominio catalítico de la PKC ζ a 25 °C en tampón en D_2O en ausencia de Mg^{2+} -ATP. Se muestra la región comprendida entre 1800-1500 cm^{-1} donde se distinguen las bandas amida I' y amida II' resultantes de la sustracción del tampón correspondiente sin proteína (A). Espectro de FT-IR del dominio Cat- ζ en la región amida I' a 25 °C y en tampón D_2O con las bandas componentes ajustadas (B). Desconvolución y derivación de la banda amida I' (C). El tampón estaba compuesto por: Tris-HCl 20 mM (pD 7,6), NaCl 200 mM, DTT 1 mM y 5 mM de MgCl_2 . La proteína se incubó a 4 °C durante toda la noche para maximizar el intercambio H-D. La concentración de proteína fue aproximadamente $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (105 μM). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue 0,04. El procedimiento para la obtención de los espectros y su procesamiento se detalla en el apartado 2.5.2.1 del Capítulo II de la presente Memoria. 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 (B).

3.1.2. Estructura secundaria de Cat- ζ en presencia de Mg²⁺-ATP.

3.1.2.1. Estructura secundaria de Cat- ζ en presencia de Mg²⁺-ATP a 25 °C.

Se estudió el efecto de diferentes ligandos sobre la estructura del dominio catalítico de la PKC ζ . Los ligandos que se utilizaron fueron el péptido pseudosustrato y el Mg²⁺-ATP siendo tan sólo este último el que produjo cambios significativos en la estructura secundaria de nuestra proteína de interés y sobre el cual hemos realizado este trabajo.

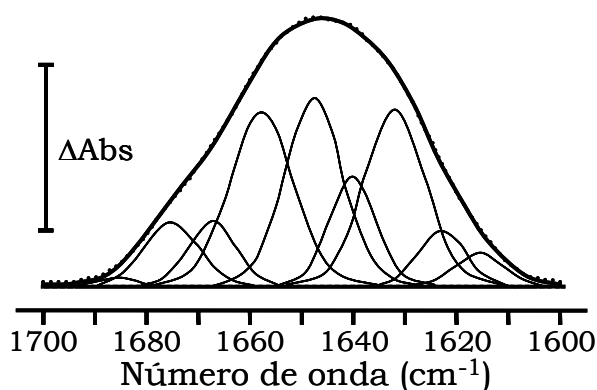


Figura VI.3. Espectro de FT-IR del dominio Cat- ζ a 25 °C en D₂O y en presencia de Mg²⁺-ATP. Se muestra el espectro de FT-IR del dominio Cat- ζ en la región amida I' a 25 °C y en tampón D₂O con las bandas componentes ajustadas y en presencia de Mg²⁺-ATP 1 mM. El tampón estaba compuesto por: Tris-HCl 20 mM (pD 7,6), NaCl 200 mM, DTT 1 mM y 5 mM de MgCl₂. La proteína se incubó a 4 °C durante toda la noche para maximizar el intercambio H-D. La concentración de proteína fue aproximadamente 5 mg·mL⁻¹ (105 μM). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue 0,04. 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.2). 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.

En la Figura VI.3. se muestra el espectro del dominio Cat- ζ en D₂O, a 25 °C y en presencia de Mg²⁺-ATP, donde aparecen 9 componentes en la banda amida I'. La presencia de este sustrato produjo un descenso en la estructura hélice α que aparece a una frecuencia 1658 cm⁻¹ pasando de un 27% en ausencia de Mg²⁺-ATP a un 23% en presencia de dicho sustrato, e igualmente se produjo una bajada de un 7% en el componente asignado como hélice 3₁₀ y bucles asociados que aparece a 1640 cm⁻¹. Sin embargo, otros componentes experimentaron un aumento en detrimento de las estructuras

anteriormente comentadas. Así, el componente que absorbe a una frecuencia de 1648 cm^{-1} correspondiente a bucles abiertos aumentó de un 16% a un 23%, experimentando así un 7% de incremento. Por otro lado, la hoja β , a 1631 cm^{-1} , alcanzó un 23% con respecto a un 17% en la estructura que no contenía Mg^{2+} -ATP. Con ello, podemos concluir que el Mg^{2+} -ATP es significativamente capaz de modular la estructura secundaria del dominio catalítico de la PKC ζ (Figura VI.3 y Tabla VI.1).

3.1.2.2. Estructura secundaria del dominio Cat ζ en presencia y ausencia de Mg^{2+} -ATP a 80 °C.

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad térmica para estudiar los cambios estructurales que ocurren durante la unión de Mg^{2+} -ATP. Los espectros del dominio Cat- ζ en tampón D_2O y en ausencia del sustrato Mg^{2+} -ATP mostraron cambios importantes en la estructura sometida a calentamiento a 80 °C (Figura VI.4A y Tabla VI.1). Estos cambios produjeron el ensanchamiento característico del proceso de desnaturalización térmica que tiene lugar en la banda amida I' consistente en el aumento de área, de un 7% a un 21% (un 14% de incremento), del componente que aparece a 1621 cm^{-1} . Esta banda se atribuye a hoja β con puentes intermoleculares y es característica de proteínas sometidas a procesos de desnaturalización térmica (Arrondo y col., 1989; Surewicz y col., 1990). Este componente indica que se produjo una agregación en las proteínas desplegadas como consecuencia de una desnaturalización térmica irreversible (Susi, 1972; Powell y col., 1986; Surewicz y col., 1990). Este aumento tiene lugar en contraste con otros componentes que sufren un descenso importante. Así, se produjo una disminución de un 14% (de 27% a 13%) en el componente hélice α y un 6% en la hoja β plegada a 1631 cm^{-1} (de 23% a 17%). Los componentes que aparecen a 1648-1649 cm^{-1} y a 1640 cm^{-1} , atribuidas a bucles grandes abiertos y a hélice 3_{10} y bucles asociados respectivamente, no variaron.

La presencia del sustrato Mg^{2+} -ATP durante el proceso de calentamiento de 25 °C a 80 °C, (Figura VI.4B) produjo protección en distintos componentes de la banda amida I', sin embargo no previno la aparición de la señal característica de desnaturalización térmica a 1621 cm^{-1} que supuso un 21% del total de la estructura (Tabla VI.1).

La estructura menos afectada por el calentamiento debido a la presencia de Mg^{2+} -ATP, fue la hélice α que mantuvo su estructura en un 18% experimentando tan sólo un descenso del 5%, frente a un 14% en ausencia de Mg^{2+} -ATP. Sin embargo, el componente asignado a 1640 cm^{-1} , hélice 3_{10} y bucles asociados, no experimentó cambio significativo alguno. Por otro lado, la hoja β plegada sufrió un descenso importante de un 23% a un 10% (un 13% en total) al igual que el componente asignado a bucles expuestos, 1647 cm^{-1} - 1648 cm^{-1} , que descendió un 8% ya que bajó de un 23% a un 15%. Por tanto, en presencia del sustrato Mg^{2+} -ATP, el componente que presenta mayor resistencia a la desnaturalización térmica es la hélice α .

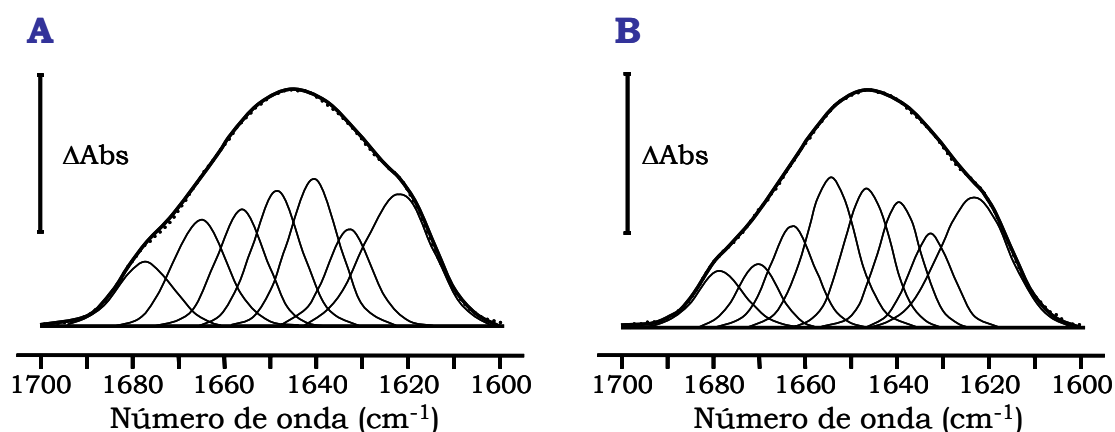


Figura VI.4. Espectros de FT-IR del dominio Cat- ζ a 80 °C, en D_2O y en ausencia (A) o presencia de Mg^{2+} -ATP (B). Se muestra el espectro de FT-IR del dominio Cat- ζ en la región amida I' a 80 °C y en tampón D_2O en ausencia (A) o presencia de Mg^{2+} -ATP 1 mM (B) con las bandas componentes ajustadas. Los tampones utilizados fueron los mismos que en el caso del análisis de la estructura secundaria a 25 °C. La concentración de proteína fue aproximadamente $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($105\text{ }\mu\text{M}$). El incremento de las unidades de absorbancia (ΔAbs) fue 0,04. 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 casos anteriores. 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.

3.1.3. Estabilidad térmica del dominio catalítico de la PKC ζ .

En la [Figura VI.5](#), se representa 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 en ausencia de Mg^{2+} -ATP el comienzo del ensanchamiento de la banda amida I' inducido por la temperatura tiene lugar a los 40 °C

mientras que en presencia de Mg²⁺-ATP ocurre a los 50 °C, indicando una vez más, el efecto protector de este sustrato.

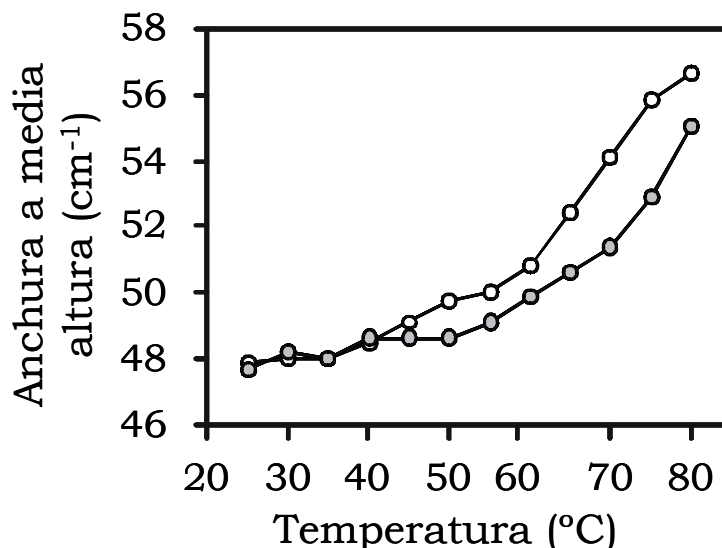


Figura VI.5. Anchura a media altura de la región amida I' de los espectros del dominio catalítico de la PKC ζ . Se muestra la anchura de banda a media altura de la región amida I' del dominio Cat- ζ en cm⁻¹ en función de la temperatura en ausencia (○) o en presencia de Mg²⁺-ATP 1 mM (●).

Para visualizar mucho mejor los cambios que tienen lugar durante la desnaturalización térmica, se representaron tridimensionalmente los espectros desconvueltos del dominio catalítico de la PKC ζ en ausencia y presencia de Mg²⁺-ATP durante el proceso de calentamiento, de 25 °C a 80 °C. En ausencia de sustrato, el ensanchamiento de la banda amida I' y la aparición de los componentes características de la agregación a 1618 cm⁻¹ y 1680 cm⁻¹, puede observarse claramente a partir de esta representación tridimensional (Figura VI.6A). Comparando esta representación con la obtenida en presencia de Mg²⁺-ATP (Figura VI.6B) también se pudieron apreciar los efectos característicos de la agregación como en el caso observado en ausencia de sustrato. El efecto protector del Mg²⁺-ATP anteriormente analizado, queda también reflejado en la representación tridimensional donde se puede apreciar que los componentes característicos de la desnaturalización y sobre todo el componente situado a 1618 cm⁻¹ aparece a 70 °C frente a los 65 °C en ausencia de Mg²⁺-ATP. De esta forma se demuestra que el Mg²⁺-ATP contribuye en menor medida al ensanchamiento de la banda amida I', característico de la desnaturalización protéica.

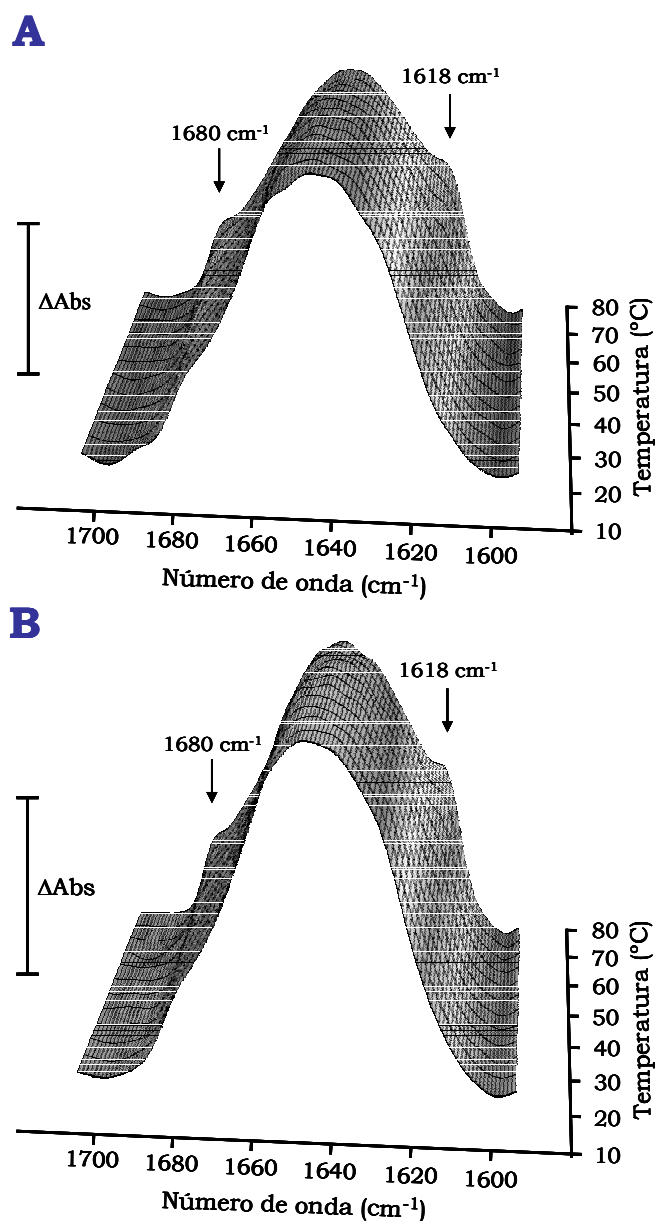


Figura VI.6. Espectros desconvueltos de FT-IR del dominio catalítico de la PKC ζ en función de la temperatura en ausencia (A) y presencia de Mg^{2+} -ATP 1 mM (B). Se muestran los espectros desconvueltos del dominio Cat- ζ en ausencia y presencia de Mg^{2+} -ATP, en sus tampones correspondientes en D_2O , en la región amida I' (1700-1600 cm^{-1}) en función de la temperatura desde 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 80 $^{\circ}\text{C}$. se destacan las señales características de la agregación a 1618 cm^{-1} y 1680 cm^{-1} con flechas. 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 absorbancia (ΔAbs) fue de 0,04.

3.2. ESTUDIOS DE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO DE CORRELACIÓN BIDIMENSIONAL.

Se llevaron a cabo análisis de correlación bidimensional teniendo en cuenta los cambios producidos en función de la temperatura con el objetivo de estudiar las diferencias estructurales del dominio catalítico de la PKC ζ en ausencia y presencia del ligando Mg²⁺-ATP. Para ello, en todos los casos se utilizó como referencia la media de los espectros obtenidos durante el barrido de temperaturas.

Este tipo de técnica ha sido ampliamente abordada en nuestro grupo para estudiar la desnaturalización térmica de los dominios C2 de las PKC clásicas (Torrecillas y col., 2003) y también en la PKC α completa (Torrecillas y col., 2004).

3.2.1. Correlación bidimensional sincrona.

El mapa de contorno del espectro de correlación sincrono de Cat- ζ en ausencia de Mg²⁺-ATP durante el calentamiento desde 25 °C a 80 °C en intervalos de 5 °C se muestra en la [Figura VI.7A](#). Se observaron dos autopicos situados a 1617 cm⁻¹ y 1657 cm⁻¹, lo que indica que los principales cambios que tuvieron lugar durante el proceso de desnaturalización de la proteína inducida por efecto de la temperatura tienen que ver con la agregación de la hoja β (1617 cm⁻¹) y la hélice α (1657 cm⁻¹). El pico cruzado más intenso se localizó entre ambos números de onda (1617-1657 cm⁻¹) y fue negativo, lo cual indica que durante el proceso de calentamiento, de 25 a 80°C, una de los componentes aumenta (la agregación de la hoja β a 1617 cm⁻¹), mientras que el otro disminuye (la hélice α a 1657 cm⁻¹). Menos intenso, pero también informativo, fue el pico cruzado entre los números de onda 1684-1659 cm⁻¹ de signo negativo, lo cual indica que el componente que aumenta asociado a la desnaturalización, es 1684 cm⁻¹, mientras que el otro disminuye, 1659 cm⁻¹. Además también se observó otro pico cruzado de signo positivo entre 1617-1684 cm⁻¹, indicando que estos dos componentes, los cuales se encuentran estrechamente ligados a la desnaturalización, están sincronizados y con ello, aumentan de forma simultánea. Todos estos resultados son consistentes con los estudios FT-IR descritos

anteriormente, donde la desaparición del componente hélice α está asociado con la aparición de la hoja β agregada intermolecular.

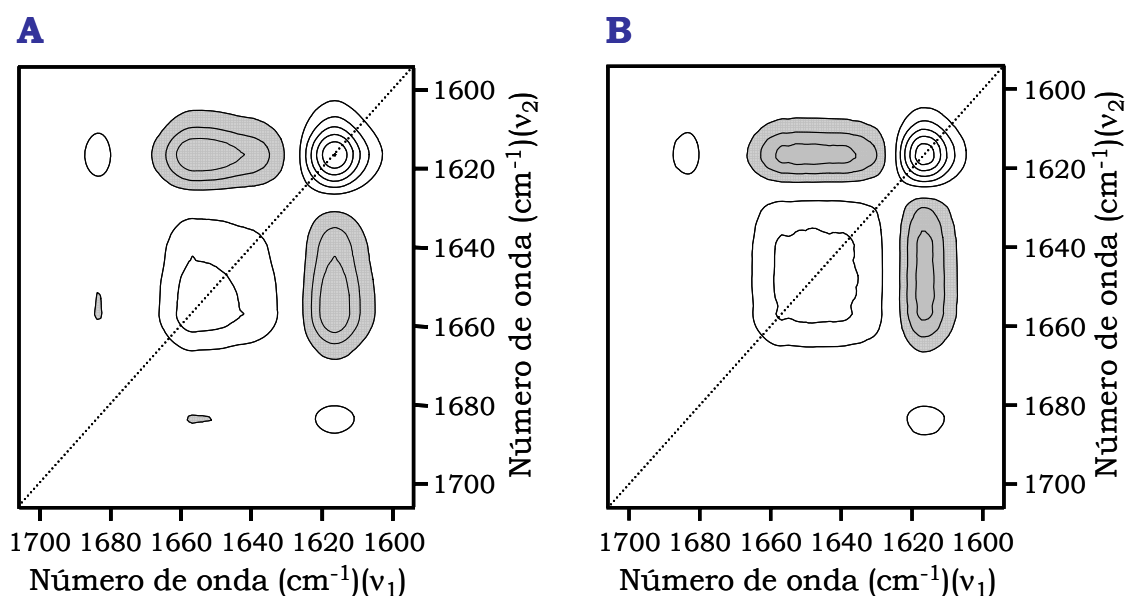


Figura VI.7. Mapa de contorno de correlación bidimensional sincrónica del dominio catalítico de la isoenzima atípica PKC ζ en función de la temperatura.

Se muestran los mapas de contorno de correlación bidimensional sincrónica del dominio Cat- ζ entre 25 °C y 80 °C en ausencia (A) y presencia de Mg²⁺-ATP 1 mM (B), obtenidos utilizando el programa 2D-Pocha (Adachi y Ozaki). Los picos blancos y grises representan las correlaciones positivas y negativas, respectivamente.

El mapa de contorno del espectro de correlación sincrónico para el barrido de temperaturas de 25 a 80 °C del dominio Cat- ζ en presencia de Mg²⁺-ATP presentó variaciones notables al obtenido en ausencia de sustrato. Así, los autopicos aparecieron centrados a 1617 cm⁻¹ y a 1648 cm⁻¹, lo cual indica que los principales cambios durante el proceso de desnaturalización térmica del dominio Cat- ζ en presencia de este sustrato tuvieron lugar en la hoja β agregada (1617 cm⁻¹) y en los bucles grandes abiertos (1648 cm⁻¹) y que la primera es la que aumenta en detrimento de la segunda. El pico cruzado más intenso apareció localizado en 1617-1652cm⁻¹ y fue negativo, indicando que la agregación de la hoja β a 1617 cm⁻¹ aumentó mientras que la hélice α o bucles abiertos disminuyó. Es de destacar que la frecuencia a 1652 cm⁻¹, es una frecuencia que no aparece en la descomposición de la banda amida I', esto puede indicar que se está produciendo un ensanchamiento del espectro (Arrondo y col., 2004) como realmente ocurre durante el proceso de desnaturalización. Finalmente, también apareció un pico de

correlación cruzada situado entre 1617-1684 cm^{-1} de signo positivo, lo cual se interpreta como un aumento simultáneo de los dos componentes que se encuentran estrechamente ligados al proceso desnaturalización protéica.

3.2.2. Correlación bidimensional asíncrona.

En las Figuras VI.8A. y VI.8B. se muestra el mapa de contorno del espectro de correlación asíncrono del dominio Cat- ζ en ausencia y en presencia de Mg^{2+} -ATP durante el proceso de calentamiento entre 25 °C y 80 °C. En ausencia de Mg^{2+} -ATP (Figura VI.8A), aparecen una serie de correlaciones entre 1614-1616 cm^{-1} y 1683 cm^{-1} , las cuales son componentes directamente asociados al proceso de desnaturalización. Así, existe un pico cruzado de signo negativo a 1614-1683 cm^{-1} , lo que indica que el aumento del componente a 1683 cm^{-1} tuvo lugar con anterioridad al aumento en el componente a 1614 cm^{-1} . Además aparece un pico cruzado a 1614-1659 cm^{-1} , que aunque es de signo positivo se encuentra en el área negativa del mapa de contorno síncrono, lo que significa que los cambios en la hélice α (desaparición) ocurrieron antes que los cambios en la agregación de la hoja β intermolecular (aumento). También se encontró un pico cruzado de signo positivo entre 1614-1659 cm^{-1} pero que sin embargo poseía signo negativo en el mapa de correlación síncrono lo que conlleva que los cambios en la hélice α a 1659 cm^{-1} tienen lugar antes que los cambios en la agregación de la hoja β a 1614 cm^{-1} . Similares situaciones ocurrieron con los picos cruzados localizados entre 1614-1649 cm^{-1} los cuales tenían signo positivo lo que significa que los cambios en los bucles abiertos a 1649 cm^{-1} tuvieron lugar con anterioridad a los cambios en el componente a 1614 cm^{-1} (hoja β agregada); de nuevo con el pico cruzado 1614-1642 cm^{-1} ocurrió una situación similar, es decir, los cambios a 1642 cm^{-1} ocurrieron antes que en el componente a 1614 cm^{-1} .

Otros picos cruzados de este mapa también pueden ser descritos en detalle, así el pico cruzado de signo positivo entre los componentes 1653-1684 cm^{-1} indican que los cambios en 1653 cm^{-1} precedieron a los cambios a 1684 cm^{-1} e igualmente con el pico cruzado situado entre 1642-1653 cm^{-1} donde los cambios en el componente 1642 cm^{-1} ocurrieron antes que a 1653 cm^{-1} . Finalmente

hay un pico cruzado entre 1653-1658 cm^{-1} de signo negativo lo que indica que los cambios a 1658 cm^{-1} tuvieron lugar con anterioridad a los cambios a 1653 cm^{-1} . La forma de mariposa de estos picos de correlación indica la existencia de un cambio en las frecuencias asociadas a la desnaturalización térmica y por tanto que la hélice α se está transformando en la estructura de bucles grandes abiertos que ocurre a una frecuencia a 1648 cm^{-1} .

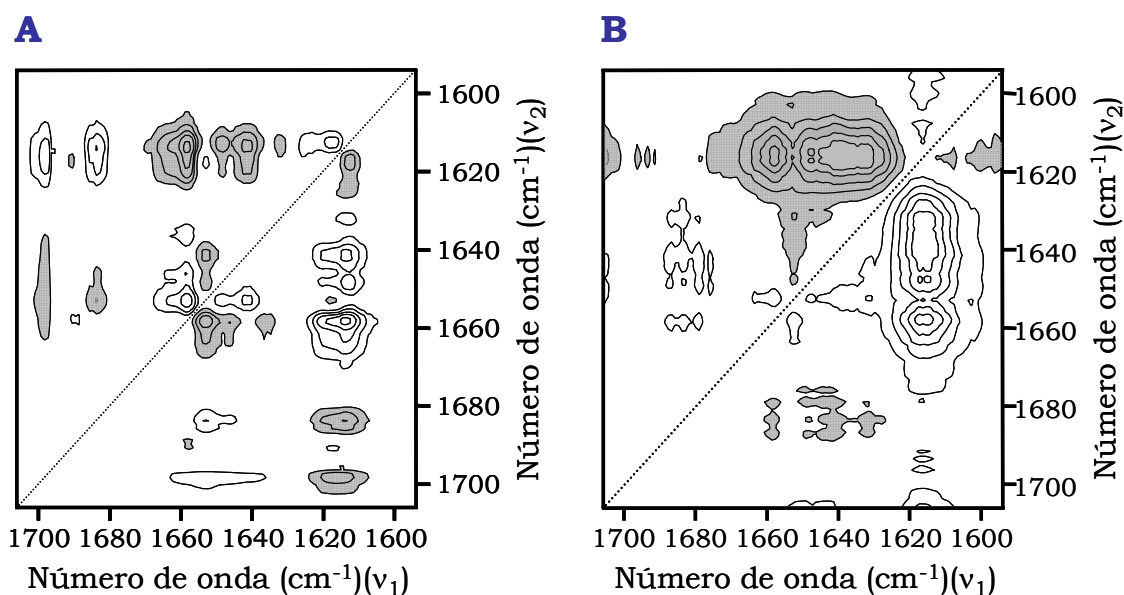


Figura VI.8. Mapa de contorno de correlación bidimensional asíncrona del dominio catalítico de la isoenzima atípica PKC ζ en función de la temperatura. Se muestran los mapas de contorno de correlación bidimensional asíncrona del dominio Cat- ζ entre 25 °C y 80 °C en ausencia (A) y presencia de Mg $^{2+}$ -ATP 1 mM (B), obtenidos utilizando el programa 2D-Pocha (Adachi y Ozaki). Los picos blancos y grises representan las correlaciones positivas y negativas, respectivamente.

La adición de Mg $^{2+}$ -ATP (Figura VI.8B), produjo un discreto cambio en el mapa de contorno de correlación asíncrono. En este caso existe una correlación un poco más ambigua, y se correlacionan el componente 1617 cm^{-1} con 1658 cm^{-1} (hélice α), con 1647 cm^{-1} (bucles grandes abiertos) y con 1640 cm^{-1} (hélice 3_{10} y bucles asociados) teniendo en todos los casos una correlación positiva mientras que si observamos el mapa síncrono poseen signo negativo, y esto significa que los cambios a 1617 cm^{-1} ocurrieron con posterioridad a los cambios en el resto de componentes, indicando así que probablemente todos ellos descienden durante el proceso de desnaturalización y por consiguiente, se fomenta la aparición del

componente asociado a la hoja β agregada intermolecular a 1617 cm^{-1} .

4. DISCUSIÓN.

Aunque se desconoce la estructura de la PKC ζ completa, así como la de su dominio catalítico, se han determinado tres dominios catalíticos de otras PKC como es el caso de la PKC θ (Xu y col., 2004; código en PDB 1XJD), la PKC ι (Messerschmidt y col., 2005; código en PDB 1ZRZ) y muy recientemente se ha resuelto el dominio catalítico de la PKC β II (Grotsky y col., 2006; código en PDB 2I0E). El dominio catalítico de la PKC θ es una estructura que aunque ha sido parcialmente determinada, es decir, sólo han sido resueltos 282 aminoácidos de los 344 totales, posee un alto grado de homología, de un 60%, con el dominio catalítico de otras isoformas de PKC clásicas y nuevas. Sin embargo el porcentaje de identidad de secuencia entre el dominio catalítico de la PKC θ y el dominio catalítico de la PKC ζ es considerablemente más bajo, tan sólo un 44%. Asimismo, cuando comparamos los dominios catalíticos de la PKC β II y Cat- ζ , el porcentaje de homología asciende a un 51,4%. Sin embargo, el porcentaje de identidad de secuencia que presenta Cat- ζ con otras quinasas como es el caso de la proteína quinasa activada por AMPc (Akamine y col., 2003; código en PDB 1J3H) es ligeramente más bajo, de un 39%. Para el caso del dominio catalítico de la PKB (Huang y col., 2003; código en PDB 1MRV) su homología con el dominio Cat- ζ es de un 48%. También es curioso que el grado de homología entre el dominio catalítico de PKC ι con el de PKC ζ , sea de un 84% esto es consecuencia de una temprana separación de las PKC atípicas del resto de proteínas quinasas en el árbol evolutivo.

Sin embargo, es sorprendente que a pesar de la relativa homología de secuencia, haya una significativa analogía en la estructura 3D de todas ellas. Así, la estructura del dominio catalítico de la PKC ι (Messerschmidt y col., 2005) es similar al de la PKC θ (Xu y col., 2004) la cual es a su vez similar al dominio catalítico de la PKB (Huang y col., 2003) y al de la PKA (Akamine y col., 2003). También es interesante destacar la analogía que presenta el dominio catalítico de la PKC β II con los dominios de la PKA y de la PKB. Dicho dominio está formado por dos lóbulos, un pequeño lóbulo en el extremo amino terminal y uno más grande en el carboxilo terminal. El Mg^{2+} -ATP se

une entre ambos lóbulos y establece interacciones de tipo polar con los residuos localizados en los lóbulos.

En este trabajo hemos estudiado la estructura secundaria del dominio catalítico de la PKC ζ , sus propiedades de desnaturalización y el efecto del Mg²⁺-ATP sobre la estructura además del posible mecanismo de protección frente a la desnaturalización térmica. La comparación de la estructura en tampón en agua normal frente a la muestra en tampón D₂O permitió la asignación de los diferentes componentes de estudio y facilitó el proceso de ajuste de la banda amida I' (Figuras VI.1 y VI.2). A 25 °C se puede concluir que la estructura secundaria incluye dos tipos de hélices, una de ellas es hélice α que absorbe a 1658 cm⁻¹ y la otra es hélice 3₁₀. La existencia de esta última se puede deducir del componente que absorbe a 1640-1641 cm⁻¹. Además, es de destacar que pueden estar presentes dos tipos de bucles, un tipo correspondiente a bucles grandes abiertos los cuales sufren un cambio de frecuencia bastante importante en presencia de D₂O (de 1657 cm⁻¹ a 1648 cm⁻¹) y el otro correspondiente al componente que absorbe a 1640-1641 cm⁻¹ el cual casi no cambia cuando se expone en tampón D₂O. Estas asignaciones son compatibles con la información disponible para otros dominios catalíticos de proteínas quinasas, tales como las Proteína quinasa dependiente de AMPc (Akamine y col., 2003), PKB (Yang y col., 2002) o PKC ι (Messerschmidt y col., 2005) que todas contienen hélice 3₁₀. Sin embargo el porcentaje de hélice 3₁₀ en todos estos dominios catalíticos, los cuales son análogos a los de la PKC ζ , es de un 3-4% (ver Tabla VI.2) y por tanto, una parte importante del 18% que aparece en la muestra a 25 °C (en ausencia de Mg²⁺-ATP) para el componente centrado a 1640 cm⁻¹ se ha asignado además a bucles ya que existe un cambio muy pequeño debido al tampón D₂O (sólo 1 cm⁻¹) y por tanto estos bucles deben estar interaccionando consigo mismos o con otras estructuras (Tabla VI.1).

Trabajos anteriores a éste, también han asignado los componentes que absorben a 1640-1643 cm⁻¹ en tampón D₂O a hélice 3₁₀ como es en el caso del citocromo b₅ (Holloway y Mantsch, 1989), α -lactoalbúmina (Prestrelski y col., 1991), estreptoquinasa (Fabian y col., 1992), pequeños péptidos basados en alanina (Miick y col., 1992) y el citocromo P-450 (Mouro y col., 1997) entre otros. Los componentes que absorben a 1640-1643 cm⁻¹ en tampón D₂O se han

asignado a bucles en estreptoquinasa (Fabian y col., 1992), centro de reacción del fotosistema II (De la Rivas y Barber, 1997) o acetilcolinesterasa (Gorne-Tschelnow y col., 1993). Por último, el hecho de que este componente apenas cambie en frecuencia en comparación al espectro en agua normal sugiere que esos bucles no se encuentran muy accesibles al disolvente.

Este trabajo de FT-IR está considerablemente avalado por la comparación de la estructura secundaria de la PKC ζ con respecto al resto de proteínas quinasas de la Familia AGC (Tabla VI.2). Así, todos los datos realizados en este trabajo sobre la estructura secundaria de la PKC ζ poseen un alto grado de concordancia con la estructura tridimensional publicada de la PKC ι (Messerschmidt y col., 2005) siendo, por otro lado, esperable debido al alto grado de homología de secuencia existente entre ambas proteínas. También es de destacar, la similitud relativamente elevada de la estructura secundaria observada para la PKA, PKB y PKC β II con respecto a la PKC ζ (Tabla VI.2).

Tabla VI.2. Comparación de la estructura secundaria de la PKC ζ con el resto de quinasas de la Familia AGC. Las estructuras se obtuvieron de: PKA (Akamine y col., 2003) (código PDB 1J3H); PKB inactiva, p.e. como apoenzima (Huang y col., 2003) (código PDB 1 MRV); PKB activa p.e. unida a AMPPNP (Yang y col., 2002) (código PDB 1O6K); PKC β II (Grodsky y col., 2006) (código PDB 2I0E); PKC ι (Messerschmidt y col., 2005) (código PDB 1ZRZ) y PKC ζ (datos tomados del espectro a 25 °C en D₂O en ausencia de Mg²⁺-ATP).

	PKA	PKB inactiva	PKB activa	PKC β II	PKC ι	PKC ζ
Hélice α	31,4	21,1	28,3	30,1	25,6	27,0
Hoja β plegada	14,0	13,0	15,2	14,5	13,7	17,0
Hélice 3 ₁₀	3,4	4,4	2,7	2,9	3,3	N.D.
Giros β	15,2	13,9	17,0	13,2	13,2	15,0

Un aspecto de interés de los dominios catalíticos de la PKC θ y de la PKC ι es que poseen 4 horquillas β (ver estructuras en PDB, códigos 1XJD y 1ZRZ respectivamente) y representan un 7% respecto del total. El componente a 1622 cm⁻¹, es normalmente asignado a péptidos con puentes de hidrógeno intramoleculares (Alvarez y col.,

1987; Arrondo y col., 1988; Arrondo y Goñi, 1999), pero también otros autores lo asignan a estructuras en horquilla β cuando se encuentra asociado a otro pico, en concreto a 1693 cm^{-1} , tanto en H_2O como en D_2O (Arrondo y col., 1996). Según esto, es de destacar que en nuestro caso hay una banda a 1691 cm^{-1} (ver [Tabla VI.1](#)) que apoya la existencia de estructuras en horquilla β . En cualquiera de los casos, el aumento en este componente observado durante el calentamiento se atribuye a la formación de hoja β agregada la cual está asociada a este proceso.

La desnaturalización térmica produjo, como hemos dicho anteriormente, un aumento en el componente a 1620 cm^{-1} , implicando un aumento en el ensanchamiento de la banda amida I' y una disminución del componente en hélice α (1657 cm^{-1}). Es de destacar, que la anchura de la banda amida I' ([Figura VI.5](#)) no es tan pronunciada como ocurre en otras proteínas, probablemente porque el proceso de desnaturalización no es tan cooperativo al menos entre 40 y $60\text{ }^\circ\text{C}$ ([Figura VI.5](#)). Estos cambios se pudieron observar mejor en el mapa 2D-IR sincrónico el cual demostró que el descenso en la hélice α se correlaciona con un aumento en la hoja β -agregada ([Figura VI.7A](#)).

El espectro de correlación 2D-IR asíncrono es compatible con la transformación de la estructura secundaria, de forma que existe un número de componentes que son transformados en hoja β agregada, especialmente los componentes: hélice α , hélice 3_{10} y bucles asociados y la hoja β .

Además, durante la desnaturalización térmica, los cambios en la hélice 3_{10} y bucles asociados y hélice α tuvieron lugar con anterioridad a los cambios en el componente bucles grandes abiertos que absorbe a 1648 cm^{-1} . Estos bucles abiertos actúan como un estado intermedio que precede a la hoja β agregada, la cual podría estar correlacionada con el hecho de que durante la desnaturalización térmica no hay cambios en el porcentaje que corresponde a estos bucles grandes abiertos, mientras que sí que existe un descenso en hélice α y en la hélice 3_{10} y bucles asociados junto con un aumento en la hoja β agregada. Con ello, se puede concluir que los bucles grandes abiertos se transforman en hoja β

agregada, aunque ésta a su vez, se genere simultáneamente a partir de los otros dos componentes de forma que se alcance una situación de equilibrio dinámico constante con respecto a su porcentaje.

El efecto del Mg²⁺-ATP sobre el dominio Cat- ζ es muy interesante desde el punto de vista de los cambios que produce en la estructura secundaria. En su presencia, se produce un aumento en el componente que absorbe a 1648 cm⁻¹ (bucles grandes abiertos) mientras que se produce un descenso en la hélice 3₁₀ y bucles asociados que indican la posibilidad de cambios en la estructura terciaria que hace que se impida la interacción entre bucles. Además de estos cambios, también se produjo una disminución en la hélice α a 1658 cm⁻¹ y un aumento de la hoja β a 1631 cm⁻¹. Asimismo, el Mg²⁺-ATP produjo una alteración en el patrón de desnaturalización del dominio Cat- ζ , ya que desempeñó un papel protector frente a la desnaturalización térmica como se demuestra en el ensanchamiento de la banda amida I'. Además también cambió el modo de alterarse la estructura por el efecto de la temperatura en presencia de este sustrato. Así, mientras que la hélice α a 1655 cm⁻¹ se preservó, el componente hoja β disminuyó considerablemente. Es importante mencionar que las diferencias significativas en la estructura secundaria de la PKB tanto en su forma inactiva (Huang y col., 2003; código en PDB 1MRV) como unida a su sustrato AMPPNP (Yang y col., 2002; código en PDB 1O6K) (ver [Tabla VI.2](#)) confirman la plasticidad de estas proteínas y su capacidad de cambiar la estructura secundaria como resultado de la interacción con sus sustratos de forma similar a la observada en el caso de la PKC ζ .

1. DISCUSIÓN GENERAL.

La familia de la PKC agrupa en mamíferos a 10 isoenzimas que participan en importantes funciones fisiológicas como son: el crecimiento, la proliferación y la diferenciación celular, la apoptosis, la reorganización del citoesqueleto y la motilidad celular, la secreción de hormonas y la respuesta inmune (Akita y col., 1994, Nishizuka, 1995, Black, 2000, Dempsey y col., 2000, Hernández y col., 2001, Brodie y Blumberg, 2003, Saijo y col., 2003, Schultz y col., 2003).

Las isoenzimas de la PKC se incluyen dentro de tres clases: PKC clásicas (PKCc), nuevas (PKCn) y atípicas (PKCa), atendiendo fundamentalmente a las diferencias que muestran en su región reguladora. En las PKCc y PKCn, la región reguladora contiene un dominio C1 y un dominio C2, mientras que las PKCa presentan un dominio C1 distinto al anterior y el dominio C2 está ausente.

El dominio C1 de las PKCc y PKCn permite la unión del diacilglicerol (DAG) y los ésteres de forbol a la proteína. Por su parte, el dominio C2 de las PKCc posibilita la unión de los fosfolípidos aniónicos de la membrana a la PKC en un proceso mediado por iones Ca^{2+} . Sin embargo en las PKCn se une a fosfolípidos aniónicos de un modo independiente de Ca^{2+} .

Además poseen un dominio catalítico que desempeña un papel funcional muy importante por ser el lugar de unión del ATP y de las proteínas sustrato a las que fosforila. La funcionalidad de este dominio es esencial para que la enzima sea catalíticamente activa y pueda llevar a cabo la fosforilación en los residuos de Ser y Thr de dichas proteínas sustrato.

Por todo ello, consideramos muy importante el estudio de los dominios de la región reguladora, C1 y C2, a la hora de intentar aclarar el proceso de regulación de las PKCs así como estudiar el dominio catalítico con el fin de conocer su estructura y cómo ésta se modula en presencia de determinados ligandos.

Las isoenzimas de la PKC difieren entre sí en varios aspectos como son, la distribución en los distintos tejidos, los mecanismos por los que se regulan, e incluso las características enzimáticas que presentan. Esta diversidad, da una idea de la dificultad que supone

la determinación del papel exacto desempeñado por cada isoenzima, dentro de la variedad de sistemas biológicos en los que interviene la PKC. Por ello, se ha estudiado el mecanismo de interacción de los dominios C1B de las PKCc y PKCn a membranas compuestas por distintos tipos de diacilgliceroles confirmando el papel crucial de este dominio en el proceso de localización y activación de la proteína.

Estudios recientes sitúan a la PKCε y al dominio C2 de la misma en un nuevo escenario donde las enzimas fosfolipasa D (PLC) y el diacilglicerol sintetizado por la vía de la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositoles (PI-PLC) están implicadas en la translocación de la PKCε a la membrana. De modo, que el POPA y el DAG actuarían de modo sinérgico en el proceso de localización de la PKCε a la membrana (López-Andreo y col., 2003).

En este sentido, nosotros hemos demostrado que existe una alta afinidad por parte del dominio C1Bε por DAGs en presencia de lípido negativo, mostrando una mayor preferencia por el POPA. Con ello, no sólo el dominio C2 estaría implicado en la unión de POPA sino que de algún modo, el dominio C1B además de interactuar con los DAGs es capaz de interactuar con los fosfolípidos aniónicos, lo que podría contribuir a aumento del tiempo de permanencia de la enzima en la membrana.

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 la isoenzima clásica PKCα y de la isoenzima nueva PKCε desde puntos de vista diferentes. Así, en el dominio C2α hemos caracterizado los mecanismos moleculares que conducen a la interacción con PtdIns(4,5)P₂ mientras que en el dominio C2ε hemos estudiado cómo se modifica, en conformación y reorganización, el POPA cuando tiene lugar la unión C2ε-POPA.

El dominio C2α, está implicado en el anclaje de la proteína a la membrana a través de la interacción con POPS y en presencia de Ca²⁺, esta unión tiene lugar a través de la denominada *región de unión de calcio* (Verdaguer y col., 1999). Posteriormente, se descubrió

la presencia de un sitio capaz de unirse a fosfolípidos aniónicos, este sitio por su proximidad a una región conservada en residuos de lisina se le denominó *región rica en lisinas*. En concreto, los residuos de lisina implicados se localizaban en las hojas $\beta 3$ y $\beta 4$ del dominio (Ochoa y col., 2002). Los últimos estudios han demostrado que a través de este sitio y mediante PtdIns(4,5)P₂ se puede activar a la PKC mediante un mecanismo distinto al propuesto para POPS (Corbalán-García y col., 2003a).

Mediante el uso combinado de las técnicas de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y de transferencia de energía de fluorescencia (FRET) hemos caracterizado el mecanismo molecular por el cual el PtdIns(4,5)P₂ interacciona específicamente con este motivo. Así, mediante la técnica de ITC hemos demostrado que este dominio es capaz de unirse a una sola molécula de PtdIns(4,5)P₂ ($n=0,72\pm 0,012$) con mayor afinidad en presencia de Ca²⁺ (K_D : 1,85 \pm 0,35 μ M) que en ausencia (K_D : 48,3 \pm 9,7 μ M).

Es importante destacar que la *región de unión de calcio* contiene cargas electrostáticas negativas debida a una región rica en residuos de Asp que se convierte en positiva cuando se une el Ca²⁺ (Murray y Honig, 2002). Este hecho permite que el dominio adopte una conformación óptima para interaccionar con la membrana aniónica a través de su *región rica en lisinas*. La utilización de diferentes mutantes de la *región de unión de calcio* (D246N/D248N) y de la *región rica en lisinas* (K197A/K199A y K209A/K211A) demostraron que la neutralización de los residuos de Asp producen una disminución en la afinidad del orden de 20 veces con respecto al dominio tipo silvestre (K_D : 26,5 \pm 5,02 μ M). Sin embargo, aún en estas condiciones, se encontraba una molécula de PtdIns(4,5)P₂ unida al dominio (n : 0,83 \pm 0,07). Por otro lado, la sustitución de dos residuos de Lys por Ala en la *región rica en lisinas* perjudicó el complejo C2-PtdIns(4,5)P₂ aún en presencia de Ca²⁺. Todo ello, sumado a que la sustitución de los residuos de la región polibásica no afectó a la unión de Ca²⁺ conlleva a deducir que tan sólo existe una posibilidad de acomodamiento del dominio que consiste en que el Ca²⁺ se sitúa por sí mismo en la *región de unión de calcio* facilitando el acceso al PtdIns(4,5)P₂ a través de la *región rica en lisinas*.

También realizamos un estudio comparativo acerca de la afinidad a otros fosfoinosítidos distintos del PtdIns(4,5)P₂ y en

presencia de Ca^{2+} . Los resultados mostraron que el modo de interacción con $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ implica un componente específico más que un mero secuestro electrostático ya que presentó mayor especificidad por $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ con respecto al resto de fosfoinosítidos altamente cargados como el $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ o $\text{PtdIns}(3,5)\text{P}_2$. Este hecho junto con que el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ se encuentra en la membrana plasmática a concentraciones más elevadas que en otros compartimentos subcelulares y en mayor proporción que otros fosfoinosítidos doble o triplemente fosforilados (Vanhaesebroeck y col., 2001) haría que aumentase la posibilidad de que la $\text{PKC}\alpha$ interaccione con el $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ en la membrana celular.

La utilización de vesículas que además de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ también contenían POPS mostraron que la presencia de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ produce una afinidad con un valor de K_D : $50 \pm 1,8$ nM, es decir, del orden de 60 veces mayor que la calculada para la unión a POPS (Kohout y col., 2002). En estas condiciones experimentales y con los mutantes de la *región de unión de calcio* y de la *región rica en lisinas*, no se alcanzó el máximo de unión en comparación con el dominio silvestre lo que significa que ambas regiones son importantes en la funcionalidad y localización del dominio en la membrana.

Por tanto, los datos obtenidos en este trabajo no invalidan el modelo clásico propuesto, sino que lo complementan ya que parece ser que una parte del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ se hidroliza en los segundos mensajeros DAG e $\text{Ins}(3,4,5)\text{P}_3$ correspondientes y otra parte del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ queda intacto y por tanto disponible para la interacción con la $\text{PKC}\alpha$ (Sánchez-Bautista y col., 2006). De esta manera, la hidrólisis del $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ inicialmente genera los picos de Ca^{2+} necesarios para producir la localización de la enzima a la membrana, pero al mismo tiempo, las moléculas de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ que permanecen sin hidrolizar en la bicapa aumentan la afinidad de la proteína para unirse a este área de la membrana a través de su dominio C2. Según estas evidencias se establece un modelo en el cual es posible que se de una doble interacción del dominio C2 con $\text{Ca}^{2+}/\text{POPS}$ y $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ a través de la *región de unión de calcio* y *región rica en lisinas* respectivamente.

El dominio C2 de la $\text{PKC}\epsilon$ se une a lípidos negativos en ausencia de Ca^{2+} . Trabajos previos utilizando la técnica de difracción de rayos X y mutagénesis dirigida (Ochoa y col., 2001; Corbalán-

García y col., 2003b; López-Andreo y col., 2003) mostraron que el modo de interacción del dominio C2 con la membrana tiene lugar a través de los residuos Trp23, Arg26 y Arg32 situados en el bucle 1 e Ile89 localizado en el bucle 3, siendo estos residuos los responsables de la interacción de tipo electrostático con la membrana (Corbalán-García y col., 2003b). En esta Memoria, la utilización de las técnicas biofísicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC), resonancia magnética nuclear por rotación a alta velocidad en el ángulo mágico (RMN-MAS) y espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) nos han permitido estudiar cómo los lípidos POPC y POPA se alteran, en conformación y organización, por la interacción electrostática con el dominio C2ε.

Los resultados de DSC confirman que el dominio C2ε es capaz de modificar la temperatura de transición del POPA, donde además de producir un aumento en la temperatura de inicio de la transición (T_0) de 16 °C a 19,6 °C, se produce un ensanchamiento en dicha transición de 1,4 °C a 2,5 °C. La utilización de mezclas compuestas por POPC/POPA a diferentes relaciones molares produjeron ligeros cambios en los diferentes parámetros termodinámicos sin llegar a producir separación de fases.

En los experimentos de RMN-MAS se demostró que el dominio C2ε interacciona mejor con POPA que con POPC. Esto se observó por un descenso hacia bajo campo del pico isotrópico de POPA y en el ensanchamiento del pico. Además, en presencia de POPA se produjeron descensos en los tiempos de relajación T_2 y T_1 a todas las temperaturas estudiadas, lo que se interpreta como un descenso en la movilidad de las cabezas polares de los lípidos debido a la interacción del dominio C2ε-POPA. Por el contrario, la presencia de POPC en las mezclas lipídicas produjo un aumento de los tiempos de relajación debido a una disminución de las interacciones entre las cabezas polares del POPA y la proteína.

Por último, los experimentos de FT-IR demostraron que la presencia del dominio C2ε produce un cambio en la conformación de la cabeza polar del lípido que se manifiesta en un aumento del porcentaje de hidratación del grupo carbonilo de POPA.

Todos estos resultados, indican la interacción de tipo electrostático que tiene lugar entre el dominio C2 de la PKCε y membranas que contienen POPA de un modo independiente de Ca^{2+} .

Estas observaciones confirman el papel del POPA en el proceso de activación de la PKC ϵ tal y como se sugirió en estudios *in vivo* (López-Andreo y col., 2003).

Al igual que la PKC, existen muchas proteínas extrínsecas que utilizan fuerzas electrostáticas para interaccionar con membranas como citocromo *c* (Rietveld y col., 1986; Rytomaa y Kinnunen, 1995), fosfolipasas (Rebecchi y col., 1992) y péptidos A β (Martínez-Senac y col., 1999).

Hasta ahora se desconoce la estructura de la PKC ζ completa así como la de su dominio catalítico. En este trabajo, hemos estudiado la estructura secundaria del dominio catalítico de la PKC ζ (Cat- ζ) en presencia de diferentes ligandos lo que supone un paso más en el análisis estructural del mismo. Para ello, hemos utilizado la espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) por ser una de las técnicas más utilizadas a la hora de analizar la estructura secundaria de proteínas. Paralelamente a la realización de este trabajo, se resolvieron mediante difracción de rayos X las estructuras de los dominios catalíticos de otras PKC como es el caso de la PKC θ (Xu y col., 2004), la PKC ι (Messerschmidt y col., 2005) y muy recientemente también se ha resuelto la estructura 3D del dominio catalítico de la PKC β II (Grodsky y col., 2006). Los resultados obtenidos de la estructura secundaria del dominio catalítico Cat- ζ mediante espectroscopía de infrarrojo fueron coherentes con las estructuras tridimensionales de los otros dominios catalíticos resueltos, poniendo de manifiesto la validez de los análisis llevados a cabo mediante esta técnica. La estructura secundaria nativa del dominio Cat- ζ obtenido mediante FT-IR en ausencia de ligando y a 25 °C mostró la presencia de dos tipos de hélices, una de ellas a 1658 cm⁻¹ con una contribución del 27% del total y la otra a 1640 cm⁻¹ asignada como hélice 3₁₀ y bucles asociados que supuso un 18% del total. La adición de Mg²⁺-ATP modificó ligeramente la estructura secundaria nativa de Cat- ζ . Así, se produjo un importante aumento de las componentes hoja β (6%) y bucles abiertos (7%) en detrimento de las componentes hélice α y hélice 3₁₀ y bucles asociados que descendieron un 4% y un 7% respectivamente. Estos cambios podrían reflejar la reordenación estructural de la región implicada en la unión del ligando Mg²⁺-ATP. A alta temperatura, aunque la presencia de ligando no previno la aparición de las señales características de desnaturalización proteica: ensanchamiento de la banda amida I' y la aparición de la hoja β

agregada sí que se observó un mantenimiento de un mayor porcentaje de hélice α . Además, mediante el estudio de la anchura a media altura y la representación tridimensional de los espectros desconvueltos, se pudo observar que el Mg^{2+} -ATP contribuye en menor medida al ensanchamiento de la banda amida I' inducido por la temperatura.

El análisis de correlación bidimensional de la desnaturalización térmica de Cat- ζ en ausencia de ligando 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 hélice α . En presencia de Mg^{2+} -ATP los principales cambios tuvieron lugar en la hoja β agregada y la componente bucles grandes abiertos. La correlación bidimensional asíncrona nos permitió establecer el orden secuencial del proceso, de modo que el aumento en la agregación de la proteína se debió a la disminución de las componentes hélice α y hoja β . además, los cambios en las componentes hélice 3_{10} y bucles asociados y en la hélice α tuvieron lugar antes que en la componente bucles grandes abiertos, lo que sugiere que esta última estructura actúe como un estado intermedio durante la desnaturalización.

El efecto de Mg^{2+} -ATP sobre el dominio Cat- ζ es muy importante desde el punto de vista de los cambios que produce en la estructura secundaria. Así, las diferencias significativas producidas en la estructura secundaria de la PKB en su forma inactiva (Huang y col., 2003) y unida unida a su sustrato (Yang y col., 2002) confirman la plasticidad de estas proteínas y la capacidad de cambiar su estructura secundaria como resultado de la interacción con sus sustratos de forma similar a la observada en el caso del dominio catalítico de la PKC ζ .

2. CONCLUSIONES.

De los resultados presentados en esta Memoria se pueden extraer las siguientes conclusiones generales:

1. El PtdIns(4,5)P₂ interacciona con el dominio C2 de la PKC α en una vía distinta a la descrita previamente para fosfatidilserina y juega un papel crítico en el proceso de localización de la enzima en la membrana plasmática. Además, mientras que la fosfatidilserina se une al dominio través de la *región de unión de calcio*, con el Ca²⁺ actuando como un puente entre la proteína y la membrana lipídica, en el modo de unión del PtdIns(4,5)P₂, el Ca²⁺ es necesario pero no media directamente la interacción del dominio-fosfoinosítido ya que el PtdIns(4,5)P₂ se une en otra región más distante, denominada *región rica en lisinas*. Todas estas evidencias sugieren un nuevo modelo de activación de la PKC α , en el cual la hidrólisis del PtdIns(4,5)P₂ inicialmente genera los picos de Ca²⁺ necesarios para producir la localización de la enzima a la membrana, pero al mismo tiempo, las moléculas de PtdIns(4,5)P₂ que permanecen sin hidrolizar en la membrana aumentan la afinidad de la proteína para unirse a este área de la membrana a través de su dominio C2.

2. El dominio C2 de la PKC ϵ muestra una preferencia por el POPA sobre POPC que se manifiesta porque en presencia de POPA se produce una modificación de la temperatura de transición, un descenso a bajo campo del pico isotrópico del POPA así como un ensanchamiento del mismo, y una disminución de los tiempos de relajación a todas las temperaturas estudiadas. Además, estructuralmente esto se manifiesta en un cambio conformacional en la cabeza polar del POPA. Estas observaciones confirman el papel del POPA en el proceso de activación de la PKC ϵ tal y como se sugirió en estudios *in vivo* para que esta enzima se encuentre regulada a través de la actividad de la fosfolipasa D.

3. Los dominios C1 desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento específico de DAG y lípidos negativos. Los datos obtenidos en este trabajo muestran un proceso de unión a DAG coadyuvado por la presencia de lípido negativo. Así, se observó un aumento gradual de la afinidad conforme aumentó la concentración de lípido negativo y/o DAG. Así, el dominio C1B δ mostró una mayor afinidad en presencia de POPS mientras que el dominio C1B ϵ fue el

que mayor afinidad presentó en todos los casos experimentales estudiados, siendo el POPA y el DOG la mezcla lipídica que inducía mayor afinidad de unión.

4. La estructura secundaria del dominio catalítico de la PKC ζ , obtenida por espectroscopía de infrarrojo es bastante similar a las estructuras de los dominios catalíticos de quinasas análogas obtenidas a alta resolución. La estructura es flexible y por tanto, se modula en presencia de su sustrato, el Mg²⁺-ATP, además de ejercer un efecto protector frente a la desnaturalización inducida por la temperatura. Durante la desnaturalización térmica, la espectroscopía de correlación bidimensional revela la vía de cómo unos componentes se van transformando en otros donde finalmente la estructura bucles abiertos precede a la formación de la hoja β agregada.

- Abbott, T.P., Wolf, W.J., Wu, Y.V., Butterfield, R.O. y Kleiman, R. (1991). *Appl. Spectrosc.* 45, 1665-1673.
- Akamine, P., Madhusudan, Wu, J., Xuong, N.H., Ten Eyck, L.F. y Taylor, S.S. (2003). Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure. *J. Mol. Biol.* 14, 159-171.
- Akers, R.F., Lovinger, D.M., Colley, P.A., Linden, D.J. y Routtenberg, A. (1986). Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science* 231, 587-589.
- Akimoto, K., Mizuno, K., Osada, S.I., Hirai, S.L., Tanuma, S.I., Suzuki, K. y Ohno, S. (1994). A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J. Biol. Chem.* 269, 12677-12683.
- Akita, Y., Ohno, S., Yajima, Y., Konno, Y., Saido, T.C., Mizuno, K., Chida, K., Osada, S., Kuroki, T. y Kawashima, S. (1994). Activation of novel protein kinases C delta and C epsilon upon mitogenic stimulation of quiescent rat 3Y1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 4653-4660.
- Alcón, S., Morales, S., Camello, P. y Pozo, M. (2002). Relaxation of canine gallbladder to nerve stimulation involves adrenergic and non-adrenergic non-cholinergic mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1157-1167.
- Alessi, D.R., Deak, M., Casamayor, A., Caudwell, F.B., Morrice, N., Norman, D.G., Gaffney, P., Reese, C.B., MacDougall, C.N., Harbison, D., Ashworth, A. y Bownes, M. (1997). 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the *Drosophila* DSTPK61 kinase. *Curr. Biol.* 7, 776-789.
- Alvarez, J., Haris, P.I., Lee, D.C. y Chapman, D. (1987). Conformational changes in concanavalin A associated with demetallization and alpha-methylmannose binding studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 916, 5-12.
- Ananthanarayanan, B., Stahelin, R.V., Digman, M.A. y Cho, W. (2003). Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are

- determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *J. Biol. Chem.* 278, 46886-46894.
- Aroca, J.D., Sánchez-Piñera, P., Corbalán-García, S., Conesa-Zamora, P., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J.C. (2001). Correlation between the effect of the anti-neoplastic ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycero-3-phosphocholine on the membrane and the activity of protein kinase Calpha. *Eur. J. Biochem.* 268, 6369-6378.
- Arrondo, J. L., Castresana, J., Valpuesta, J. M. y Goñi, F. M. (1994a). Structure and thermal denaturation of crystalline and noncrystalline cytochrome oxidase as studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 33, 11650-11655.
- Arrondo, J. L., Etxabe, I., Dornberger, U. y Goñi, F. M. (1994b). Probing protein conformation by infrared spectroscopy. *Biochem. Soc. Trans.* 22, 380S.
- Arrondo, J.L. y Goñi, F.M. (1999). Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 72, 367-405.
- Arrondo, J.L., Blanco, F.J., Serrano, L. y Goñi, F.M. (1996). Infrared evidence of a beta-hairpin peptide structure in solution. *FEBS Lett.* 384, 35-37.
- Arrondo, J.L., Iloro, I., Aguirre, J. y Goñi, F.M. (2004) A two-dimensional IR spectroscopic (2D-IR) simulation of protein conformational changes. *Spectrosc. Int. J.* 18, 49-58.
- Arrondo, J.L., Muga, A., Castresana, J., Bernabeu, C. y Goñi, F.M. (1989) An infrared spectroscopic study of β -galactosidase structure in aqueous solutions. *FEBS Lett.* 252, 118-120.
- Arrondo, J.L., Young, N.M. y Mantsch, H.H. (1988). The solution structure of concanavalin A probed by FT-IR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 952, 261-268.
- Arrondo, J.L., Goñi, F.M. y Macarulla, J.M. (1984). Infrared spectroscopy of phosphatidylcholines in aqueous suspension. A study of the phosphate group vibrations. *Biochim. Biophys. Acta* 794, 164-168.

- Arrondo, J.L., Muga, A., Castresana, J. y Goñi, F.M. (1993). Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59, 23-56.
- Arrondo, J.L.R., Young, N.M. y Mantsch, H.H. (1988). The solution structure of concanavalin A probed by FT-IR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 952, 261-268.
- Asaoka, Y., Yoshida, K., Oka, M., Shinomura, T., Mishima, H., Matsushima, S. y Nishizuka, Y. (1992). The signal-induced phospholipid degradation cascade and protein kinase C activation. *Ciba Found Symp.* 164, 50-65.
- Ashendel, C. L. (1985). The phorbol ester receptor: a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 822, 219-242.
- Ataka, K. y Osawa, M. (1998) *Langmuir* 14, 951-959.
- Axelrod, J. (1990). Receptor-mediated activation of phospholipase A2 and arachidonic acid release in signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 503-507.
- Baeuerle, P.A., Lenardo, M., Pierce, J.W. y Baltimore, D (1988). Phorbol-ester-induced activation of the NF-kappa β transcription factor involves dissociation of an apparently cytoplasmic NF-kappa β /inhibitor complex. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 53, 789-798.
- Bai, J. y Chapman, E.R. (2004). The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. *Trends Biochem. Sci.* 29, 143-145.
- Bai, J., Tucker, W.C. y Chapman, E.R. (2004). PIP₂ increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 36-44.
- Balafanova, Z., Bolli, R., Zhang, J., Zheng, Y., Pass, J.M., Bhatnagar, A., Tang, X.L., Wang, O., Cardwell, E. y Ping, P. (2002). Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase C ϵ (PKC ϵ), facilitating PKC ϵ translocation via enhanced PKC ϵ -RACK2 interactions: a novel

- mechanism of no-triggered activation of PKC ϵ . *J. Biol. Chem.* 277, 15021-15027.
- Balendran, A., Hare, G.R., Kieloch, A., Williams, M.R. y Alessi, D.R. (2000). Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett.* 484, 217-223.
- Balsinde, J. y Balboa, M.A. (2005). Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal* 17, 1052-1062.
- Banci, L., Cavallaro, G., Kheifets, V. y Mochly-Rosen, D. (2002). Molecular dynamics characterization of the C2 domain of protein kinase C β . *J. Biol. Chem.* 277, 12988-12997.
- Bandekar, J. (1992). Amide modes and protein conformation. *Biochim. Biophys. Acta* 1120, 123-143.
- Bandekar, J. y Krimm, S. (1980). Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins. VI. Assignment of beta-turn modes in insulin and other proteins. *Biopolymers* 19, 31-36.
- Basu, A., Lu, D., Sun, B., Moor, A.N., Akkaraju, G.R. y Huang, J. (2002). Proteolytic activation of protein kinase C-epsilon by caspase-mediated processing and transduction of antiapoptotic signals. *J. Biol. Chem.* 277, 41850-41856.
- Bax, A. (1982). "Two dimensional nuclear magnetic resonance in liquids" Reidel Ed., Boston, U.S.A.
- Bazzi, M. D. y Nelsestuen, G. L. (1987). Association of protein kinase C with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 26, 115-122.
- Becker, K.P. y Hannun, Y.A. (2003). cPKC-dependent sequestration of membrane-recycling components in a subset of recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* 278, 52747-52754.
- Behn-Krappa, A. y Newton, A.C. (1999). The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr. Biol.* 9, 728-737.

- Bell, R.M. (1986). Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell* 45, 631-632.
- Bell, R.M. y Burns, D.J. (1991). Lipid activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266, 4661-4664.
- Benes, C.H., Wu, N., Elia, A.E., Dharia, T., Cantley, L.C. y Soltoff, S.P. (2005). The C2 domain of PKC δ is a phosphotyrosine binding domain. *Cell* 121, 271-280.
- Benowitz, L.I., Perrone-Bizzozero, N.I. y Finklestein, S.P. (1987). Molecular properties of the growth-associated protein GAP-43 (B-50). *J. Neurochem.* 48, 1640-1647.
- Berra, E., Díaz-Meco, M.T., Domínguez, I., Municio, M.M., Sanz, L., Lozano, J., Chapkin, R.S. y Moscat, J. (1993). Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 74, 555-563.
- Besson, A., Wilson, T.L. y Yong, V.W. (2002). The anchoring protein RACK1 links protein kinase C ϵ to integrin β chains. Requirements for adhesion and motility. *J. Biol. Chem.* 277, 22073-22084.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Bittova, L., Stahelin, R.V. y Cho, W. (2001). Roles of ionic residues of the C1 domain in protein kinase C- α activation and the origin of phosphatidylserine specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 4218-4226.
- Bjorkoy, G., Perander, M., Overvatn, A. y Johansen, T. (1997). Reversion of Ras- and phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C-mediated transformation of NIH 3T3 cells by a dominant interfering mutant of protein kinase C λ is accompanied by the loss of constitutive nuclear mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 11557-11565.
- Blobe, G.C., Stribling, D.S., Fabbro, D., Stabel, S. y Hannun, Y.A. (1996). Protein kinase C beta II specifically binds to and is activated by F-actin. *J. Biol. Chem.* 271, 15823-15830.

- Blumberg, P.M. (1988). Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 48, 1-8.
- Blume, A., Hübner, W. y Messner, G. (1988). Fourier transform infrared spectroscopy of $^{13}\text{C}=\text{O}$ -labeled phospholipids hydrogen bonding to carbonyl groups. *Biochemistry* 27, 8239-8249.
- Bogi, K., Lorenzo, P.S., Szallasi, Z., Acs, P., Wagner, G.S. y Blumberg, P.M. (1998). Differential selectivity of ligands for the C1a and C1b phorbol ester binding domains of protein kinase C δ : possible correlation with tumor-promoting activity. *Cancer Res.* 58, 1423-1428.
- Bokvist, M., Lindstrom, F., Watts, A. y Gröbner, G. (2004). Two types of Alzheimer's β -amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation. *J. Mol. Biol.* 335, 1039-1049.
- Bolen, E.J. y Sando, J.J. (1992). Effect of phospholipid unsaturation on protein kinase C activation. *Biochemistry* 31, 5945-5951.
- Bolsover, S., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2003). Role of the Ca^{2+} /phosphatidylserine binding region of the C2 domain in the translocation of protein kinase C α to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 10282-10290.
- Bonev, B.B., Watts, A., Bokvist, M. y Gröbner, G. (2001). Electrostatic peptide-lipid interactions of amyloid- peptide and pentalysine with membrane surfaces monitored by P-31 MAS NMR, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3, 2904-2910.
- Bonev, B.B., Lam, Y.H., Anderluh, G., Watts, A., Norton, R.S., y Separovic, F. (2003). Effects of the eukaryotic pore-forming cytolytic toxin Equinatoxin II on lipid membranes and the role of sphingomyelin. *Biophys. J.* 84, 2382-2392.
- Bornancin, F. y Parker, P.J. (1996). Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase C α . *Curr. Biol.* 6, 1114-1123.

- Bornancin, F. y Parker, P.J. (1997). Phosphorylation of protein kinase C- α on serine 657 controls the accumulation of active enzyme and contributes to its phosphatase-resistant state. *J. Biol. Chem.* 272, 3544–3549.
- Boskovic, G., Desai, D. y Niles, R.M. (2002). Regulation of retinoic acid receptor α by protein kinase C in B16 mouse melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 277, 26113-26119.
- Böttcher, C.J.F., Van Gent, C.M. y Priest, C. (1961). A rapid and sensitive submicro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta* 24, 203-204.
- Brodie, C., Bogi, K., Acs, P., Lazarovici, P., Petrovics, G., Anderson, W. B. y Blumberg, P. M. (1999). Protein kinase C- ϵ plays a role in neurite outgrowth in response to epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *Cell Growth Differ.* 10, 183-191.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y. y Sudhof, T.C. (1995). Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 25273-25280.
- Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Díaz-Meco, M.T., Moscat, J., Rapp, U. y Cooper, G.M. (1997). Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 17, 732-741.
- Caloca, M.J., Fernández, N., Lewin, N.E., Ching, D., Modali, R., Blumberg, P.M. y Kazanietz, M.G. (1997). β 2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters. *J. Biol. Chem.* 272, 26488-26496.
- 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.
- Canagarajah, B., Leskow, F.C., Ho, J.Y., Mischak, H., Saidi, L.F., Kazanietz, M.G. y Hurley, J.H. (2004). Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, β 2-chimaerin. *Cell* 119, 407-418.

- Carbone, M.A. y Macdonald, P.M. (1996). Cardiotoxin II segregates phosphatidylglycerol from mixtures with phosphatidylcholine: (31)P and (2)H NMR spectroscopic evidence. *Biochemistry* 35, 3368-3378.
- Caroni, P. (2001). New EMBO members' review: actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P(2) rafts. *EMBO J.* 20, 4332-4336.
- Carrasco, S. y Mérida, I. (2004). Diacylglycerol-dependent binding recruits PKC θ and RasGRP1 C1 domains to specific subcellular localizations in living T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell* 15, 2932-2942.
- Casal, H.L. y Mantsch, H.H. (1984). Polymorphic phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 779, 381-401.
- Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.
- Cazaubon, S., Bornancin, F. y Parker, P.J. (1994). Threonine-497 is a critical site for permissive activation of protein kinase C α . *Biochem. J.* 301, 443-448.
- Cenni, V., Doppler, H., Sonnenburg, E.D., Maraldi, N., Newton, A.C. y Toker, A. (2002). Regulation of novel protein kinase C ϵ by phosphorylation. *Biochem. J.* 363, 537-545.
- Chan, S.Y., Murakami, K. y Routtenberg, A (1986). Phosphoprotein F1: purification and characterization of a brain kinase C substrate related to plasticity. *J. Neurosci.* 6, 3618-3627.
- Chapline, C., Mousseau, B., Ramsay, K., Duddy, S., Li, Y., Kiley, S.C. y Jaken, S. (1996). Identification of a major protein kinase C-binding protein and substrate in rat embryo fibroblasts. Decreased expression in transformed cells. *J. Biol. Chem.* 271, 6417-6422.
- Chapman, D. y Wallach, D.F.H. (1968) "Biological membranes" (D. Chapman, ed.). Academic Press, Nueva York.

- Chapman, D., Gómez-Fernández, J.C. y Goñi, F.M. (1982). *Trends Biochem. Sci.* 7, 67-70.
- Chapman, D., Oldfield, E., Doskocilova, D. y Schneider, B. (1972). NMR of gel and liquid crystalline phospholipids spinning at the 'magic angle'. *FEBS Lett.* 25, 261-264.
- Cheng, X., Ma, Y., Moore, M., Hemmings, B.A. y Taylor, S.S. (1998). Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9849-9854. [
- Cho, W. y Stahelin, R.V. (2005). Membrane-protein interactions in cell signaling and membrane trafficking. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34, 119-151.
- 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). Regulation of protein kinase C ζ by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* 6, 1069-1077.
- Cladera, J., Galisteo, H.L., Sabes, M., Mateo, P.L. y Padros, E. (1992). The role of retinal in the thermal stability of the purple membrane. *Eur. J. Biochem.* 207, 581-585.
- Cohen, P. (2002). Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century?. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1, 309-315.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W. y Helling, R.B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3240-3248.
- Comalada, M., Xaus, J., Valledor, A.F., López-López, C., Pennington, D.J. y Celada, A. (2003). PKC ϵ is involved in JNK activation that mediates LPS-induced TNF- α , which induces apoptosis in macrophages. *Am. J. Physiol.* 285, C1235-C1245.
- Conesa-Zamora, P., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2000). The C2 domain of protein kinase α is directly involved in the diacylglycerol-dependent binding of the C1 domain to the membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1487, 246-254.

- Conesa-Zamora, P., López-Andreo, M.J., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2001). Identification of the phosphatidylserine binding site in the C2 domain that is important for PKC α activation and in vivo cell localization. *Biochemistry* 40, 13898-13905.
- Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J.C. (2006). Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 7, 633-654.
- Corbalán-García, S., García-García, J., Rodríguez-Alfaro, J.A. y Gómez-Fernández, J.C. (2003a). A new phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site located in the C2 domain of protein kinase C α . *J. Biol. Chem.* 278, 4972-4980.
- Corbalán-García, S., Margarit, S.M., Galron, D., Yang, S.S. y Bar-Sagi, D. (1998). Regulation of Sos activity by intramolecular interactions. *Mol. Cell Biol.* 18, 880-886.
- Corbalán-García, S., Rodríguez-Alfaro, J.A. y Gómez-Fernández, J.C. (1999). Determination of the calcium-binding sites of the C2 domain of protein kinase C α that are critical for its translocation to the plasma membrane. *Biochem. J.* 337, 513-521.
- Corbalán-García, S., Sánchez-Carrillo, S., García-García, J. y Gómez-Fernández, J.C. (2003b). Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC ϵ . *Biochemistry* 42, 11661-11668.
- Corbalán-García, S., Teruel, J.A., Villalaín, J. y Gómez-Fernández, J.C. (1994). Extensive proteolytic digestion of the (Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase from sarcoplasmic reticulum leads to a highly hydrophobic proteinaceous residue with a mainly alpha-helical structure. *Biochemistry* 33, 8247-8254.
- Coussens L., Parker P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield M.D., Francke, U. y Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233, 859-866.
- Cross, H.R., Murphy, E., Bolli, R., Ping, P. y Steenbergen, C. (2002). Expression of activated PKC epsilon (PKC ϵ) protects the ischemic

- heart, without attenuating ischemic H(+) production. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 361-367.
- Csukai, M., Chen, C.H., De Matteis, M.A. y Mochly-Rosen, D. (1997). The coatomer protein β '-COP, a selective binding protein (RACK) for protein kinase Cepsilon. *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). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20, 448-455.
- Czech, M.P. (2000). PIP₂ and PIP₃: complex roles at the cell surface. *Cell* 100, 603-606.
- Daniel, L.W., Civoli, F., Rogers, M.A., Smitherman, P.K., Raju, P.A. y Roederer, M. (1995). ET-18-OCH₃ inhibits nuclear factor-kappa β activation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate but not by tumor necrosis factor-alpha or interleukin 1 alpha. *Cancer Res.* 55, 4844-4849.
- De las Rivas, J. y Barber, J. (1997). Structure and thermal stability of photosystem II reaction centers studied by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 36, 8897-8903.
- Dekker, L.V. y Parker, P.J. (1994). Protein kinase C--a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* 19, 73-77.
- Dekker, L.V. y Parker, P.J. (1997). Regulated binding of the protein kinase C substrate GAP-43 to the V0/C2 region of protein kinase C-delta. *J. Biol. Chem.* 272, 12747-12753.
- Dekker, L.V., McIntyre, P. y Parker, P.J. (1993). Mutagenesis of the regulatory domain of rat protein kinase C-eta. A molecular basis for restricted histone kinase activity. *J. Biol. Chem.* 268, 19498-19504.
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A. y Messing, R.O. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279, L429:438.

- DeRiemer, S.A., Strong, J.A., Albert, K.A., Greengard, P. y Kaczmarek, L.K. (1985). Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. *Nature* 313, 313-316.
- Desormeaux, A., Laroche, G., Bougis, P.E., y Pezolet, M. (1992). Characterization by infrared spectroscopy of the interaction of a cardiotoxin with phosphatidic acid and with binary mixtures of phosphatidic acid and phosphatidylcholine. *Biochemistry* 31, 12173-12182.
- Díaz-Meco, M. y Moscat, J. (2001). MEK5, a new target of the atypical protein kinase C isoforms in mitogenic signaling. *Mol. Cell Biol.* 4, 1218-1227.
- Dibble, A.R., Hinderliter, A.K., Sando, J.J. y Bittonen, R.L. (1996). Lipid lateral heterogeneity in phosphatidylcholine/phosphatidylserine/diacylglycerol vesicles and its influence on protein kinase C activation. *Biophys. J.* 71, 1877-1890.
- Dieterich, S., Herget, T., Link, G., Bottinger, H., Pfizenmaier, K. y Johannes, F.J. (1996). In vitro activation and substrates of recombinant, baculovirus expressed human protein kinase C μ . *FEBS Lett.* 381, 183-187.
- Downes, C.P., Gray, A. y Lucocq, J.M. (2005). Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends Cell Biol.* 15, 259-268.
- Dutil, E.M. y Newton, A.C. (2000). Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 275, 10697-10701.
- Dutil, E.M., Keranen, L.M., DePaoli-Roach, A.A. y Newton, A.C. (1994). In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269, 29359-29362.
- Dutil, E.M., Toker, A. y Newton, A.C. (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* 8, 1366-1375.

- Edwards, A.S. y Newton, A.C. (1997). Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272, 18382-18390.
- Edwards, A.S., Faux, M.C., Scott, J.D. y Newton, A.C. (1999). Carboxyl-terminal phosphorylation regulates the function and subcellular localization of protein kinase C betaII. *J. Biol. Chem.* 274, 6461-6468.
- Elliot, A. y Ambrose, E.J. (1950). *Nature* 165, 921-922.
- England, K., Watson, J., Beale, G., Warner, M., Cross, J. y Rumsby, M. (2001). Signalling pathways regulating the dephosphorylation of Ser729 in the hydrophobic domain of protein kinase Cepsilon upon cell passage. *J. Biol. Chem.* 276, 10437-10442.
- Eppand, R.M. (1998). Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 353-368.
- Ernst, C.R., Bodenhausen, G. y Wokaun, 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). Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C delta. *Nature* 380, 595-602.
- Evans, J.H., Murray, D., Leslie, C.C. y Falke, J.J. (2006). Specific translocation of protein kinase Calpha to the plasma membrane requires both Ca²⁺ and PIP₂ recognition by its C2 domain. *Mol. Biol. Cell* 17, 56-66.
- Fabian, H., Naumann, D., Misselwitz, R., Ristau, O., Gerlach, D. y Welfle, H. (1992). Secondary structure of streptokinase in aqueous solution: a Fourier transform infrared spectroscopic study. *Biochemistry* 31, 6532-6538.
- Feng, X., Becker, K.P., Stribling, S.D., Peters, K.G. y Hannun, Y.A. (2000). Regulation of receptor-mediated protein kinase C membrane trafficking by autophosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275, 17024-17034.

- Flint, A.J., Paladini, R.D. y Koshland, D.E. Jr. (1990). Autophosphorylation of protein kinase C at three separated regions of its primary sequence. *Science* 249, 408-411.
- Ford, D.A. y Gross, R.W. (1990). Differential metabolism of diradyl glycerol molecular subclasses and molecular species by rabbit brain diglyceride kinase. *J. Biol. Chem.* 265, 12280-12886.
- Ford, M.G., Pearse, B.M., Higgins, M.K., Vallis, Y., Owen, D.J., Gibson, A., Hopkins, C.R., Evans, P.R. y McMahon, H.T. (2001). Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P₂ and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. *Science* 291, 1051-1055.
- Förster, T. (1966) *Modern Quantum Chemistry*, Ed. O. Sinanglu, Sección II-B, 93-137, New York Academic Press.
- Fowler, L., Everitt, J.L., Stevens, J.L. y Jaken, S. (1998b). Redistribution and enhanced protein kinase C-mediated phosphorylation of alpha- and gamma-adducin during renal tumor progression. *Cell Growth Diff.* 9, 405-413.
- Fowler, L., Dong, L.Q., Van der Water, B., Bowes, R., Stevens, J.L. y Jaken, S. (1998a). Transformation-sensitive changes in expression, localization, and phosphorylation of adducins in renal proximal tubule epithelial cells. *Cell Growth Diff.* 9, 177-184.
- Fraser, R.D.B. y MacRae, T.P. (1973). *Academic Press*. New York.
- Fujita, N., Sato, S., Ishida, A. y Tsuruo, T. (2002). Involvement of Hsp90 in signaling and stability of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J. Biol. Chem.* 277, 10346-10353.
- Gambhir, A., Hangyas-Mihalayne, G., Zaitseva, I., Cafiso, D.S., Wang, J., Murray, D., Pentylala, S.N., Smith, S.O. y McLaughlin, S. (2004). Electrostatic sequestration of PIP₂ on phospholipid membranes by basic/aromatic regions of proteins. *Biophys. J.* 86, 2188-2207.
- Ganong, B.R., Loomis, C.R., Hannun, Y.A. y Bell, R.M. (1986). Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 1184-1188.

- Gao, T. y Newton, A.C. (2002). The turn motif is a phosphorylation switch that regulates the binding of Hsp70 to protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 277, 31585–31592.
- Gao, T., Toker, A. y Newton, A.C. (2001). The carboxyl terminus of protein kinase c provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *J. Biol. Chem.* 276, 19588-19256.
- García-García, J., Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J.C. (1999). Effect of calcium and phosphatidic acid binding on the C2 domain of PKC alpha as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 38, 9667-9675.
- García-García, J., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S (2001). Structural characterization of the C2 domain of novel protein kinase Cepsilon. *Eur. J. Biochem.* 268, 1107-1117.
- Ghosh, S. y Baltimore, D. (1990). Activation in vitro of NF-kappa β by phosphorylation of its inhibitor I kappa β . *Nature* 344, 678-682.
- Ghosh, S., Xie, W.Q., Quest, A.F., Mabrouk, G.M., Strum, J.C. y Bell, R.M. (1994). The cysteine-rich region of raf-1 kinase contains zinc, translocates to liposomes, and is adjacent to a segment that binds GTP-ras. *J. Biol. Chem.* 269, 10000-10007.
- Gil, C., Molina, E., Plana, M., Carabaz, A., Cabre, F., Mauleon, D., Carganico, G. e Itarte, E. (1996). Differential effect of alkyl chain-modified ether lipids on protein kinase C autophosphorylation and histone phosphorylation. *Biochem. Pharmacol.* 52, 1843-1847.
- Goldberg, E.M. y Zidovetzki, R. (1998). Synergistic effects of diacylglycerols and fatty acids on membrane structure and protein kinase C activity. *Biochemistry* 37, 5623-5632.
- Golub, T. y Pico, C. (2005). Spatial control of actin-based motility through plasmalemmal PtdIns(4,5)P₂-rich raft assemblies. *Biochem. Soc. Symp.* 72, 119-127.
- Goormaghtigh, E., de Mentter, J.M., Vanloo, B., Brasseur, R., Rossenen, M. y Ruysschaert, J.M. (1989). Evaluation of the secondary structure of apo

- B-100 in low-density lipoprotein (LDL) by infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1006, 147-150.
- Gorne-Tschelnokow, U., Naumann, D., Weise, C. y Hucho, F. (1993). Secondary structure and temperature behaviour of acetylcholinesterase. Studies by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 213, 1235-1242.
- Grodsky, N., Li, Y., Bouzida, D., Love, R., Jensen, J., Nodes, B., Nonomiya, J. y Grant, S. (2006). Structure of the catalytic domain of human protein kinase C beta II complexed with a bisindolylmaleimide inhibitor. *Biochemistry* 45, 13970-13981.
- Gysin, S. e Imber, R. (1996). Replacement of Ser657 of protein kinase C-alpha by alanine leads to premature down regulation after phorbol-ester-induced translocation to the membrane. *Eur. J. Biochem.* 240, 747-750.
- Gysin, S. e Imber, R. (1997). Phorbol-ester-activated protein kinase C-alpha lacking phosphorylation at Ser657 is down-regulated by a mechanism involving dephosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 249, 156-160.
- Hall, C., Monfries, C., Smith, P., Lim, H.H., Kozma, R., Ahmed, S., Vanniasingham, V., Leung, T. y Lim, L. (1990). Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase C and BCR, the product of the breakpoint cluster region gene. *J. Mol. Biol.* 211, 11-16.
- Hamilton, J.A., Fujito, D.T. y Hammer, C.F. (1991). Solubilization and localization of weakly polar lipids in unsonicated egg phosphatidylcholine: A ¹³C MAS NMR study. *Biochemistry* 30, 2894-2902.
- Hancock, J.F., Paterson, H. y Marshall, C.J. (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 6, 133-139.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. y Hunter, T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42-52.

- Hannun, Y.A., Loomis, C.R. y Bell, R.M. (1986). Protein kinase C activation in mixed micelles. Mechanistic implications of phospholipid, diacylglycerol, and calcium interdependencies. *J. Biol. Chem.* 261, 7184-7190.
- Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Nairn, A.C. y Aderem, A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356, 618-622.
- Heimburg, T., Schuenemann, J., Weber, K. y Geisler, N (1996). Specific recognition of coiled coils by infrared spectroscopy: analysis of the three structural domains of type III intermediate filament proteins. *Biochemistry* 35, 1375-1382.
- Heitz, F. y Van Mau, N. (2002). Protein structural changes induced by their uptake at interfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 1597, 1-11.
- Heo, W.D., Inoue, T., Park, W.S., Kim, M.L., Park, B.O., Wandless, T.J., Meyer, T. (2006). PI(3,4,5)P₃ and PI(4,5)P₂ lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* 314, 1458-1461.
- Hernández-Caselles, T., Villalaín, J. y Gómez-Fernández, J.C. (1993). Influence of liposome charge and composition on their interaction with human blood serum proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 120, 119-126.
- Herzyk, E., Lee, D.C., Dunn, R.C., Bruckdorfer, K.R. y Chapman, D. (1987). Changes in the secondary structure of apolipoprotein B-100 after Cu²⁺-catalysed oxidation of human low-density lipoproteins monitored by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 922, 145-154.
- Hinderliter, A.K., Dibble, A.R.G., Biltonen, R.L. y Sando, J.J. (1997). Activation of protein kinase C by coexisting diacylglycerol-enriched and diacylglycerol-poor lipid domains. *Biochemistry* 36, 6141-6148.
- Hirai, T. y Chida, K. (2003). Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. *J. Biochem. (Tokyo)* 133, 1-7.
- Hofmann, J. (1994). Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 4, 125-146.

- Hofmann, J. (1997). The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* 11, 649-669.
- Holbrook, P.G., Pannell, L.K., Murata, Y. y Daly, J.W. (1992). Molecular species analysis of a product of phospholipase D activation. Phosphatidylethanol is formed from phosphatidylcholine in phorbol ester- and bradykinin-stimulated PC12 cells. *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). The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of the antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry* 36, 9663-9673.
- Hommel, U., Zurini, M. y Luyten, M. (1994). Solution structure of a cysteine rich domain of rat protein kinase C. *Struct. Biol.* 1, 383-387.
- Hope, M.J. y Cullis, P.R. (1980). Effects of divalent cations and pH on phosphatidylserine model membranes: a ³¹P NMR study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 846-852.
- House, C. y Kemp, B.E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 238, 1726-1728.
- Hovius, R., Vallotton, P., Wohland, T. y Vogel, H. (2000). Fluorescence techniques: shedding light on ligand-receptor interactions. *Trends Pharmac. Sci.* 27, 266-273.
- Huang, X., Begley, M., Morgenstern, K.A., Gu, Y., Rose, P., Zhao, H. y Zhu, X. (2003). Crystal structure of an inactive Akt2 kinase domain. *Structure (Camb)* 11, 21-30.
- Hubbard, S.R., Bishop, W.R., Kirschmeier, P., George, S.J., Cramer, S.P. y Hendrickson, W.A. (1991). Identification and characterization of zinc binding sites in protein kinase C. *Science* 254, 1776-1779.
- Huber, R., Schneider, M., Mayr, I., Romisch, J. y Paques, E.P. (1990). The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure

- analysis at 2.0 Å resolution. Implications for membrane binding and calcium channel activity. *FEBS Lett.* 275, 15-21.
- Hug, H. y Sarre T.F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?. *Biochem. J.* 291, 329-343.
- Hunn, M. y Quest, A.F. (1997). Cysteine-rich regions of protein kinase Cdelta are functionally non-equivalent. Differences between cysteine-rich regions of non-calcium-dependent protein kinase Cdelta and calcium-dependent protein kinase Cgamma. *FEBS Lett.* 400, 226-232.
- Hurley, J.H. y Meyer, T. (2001). Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 146-152.
- Hurley, J.H., Newton, A.C., Parker, P.J., Blumberg, P.M. y Nishizuka, Y. (1997). Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.* 6, 477-480.
- Huse, M. y Kuriyan, J. (2002). The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282
- Inagaki, K., Begley, R., Ikeno, F. y Mochly-Rosen, D. (2005). Cardioprotection by epsilon-protein kinase C activation from ischemia: continuous delivery and antiarrhythmic effect of an epsilon-protein kinase C-activating peptide. *Circulation* 111, 44-50.
- Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y. y Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.* 252, 7610-7616.
- Irie, K., Nakahara, A., Nakagawa, Y., Ohigashi, H., Shindo, M., Fukuda, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Kashiwagi, K. y Saito, N. (2002). Establishment of a binding assay for protein kinase C isozymes using synthetic C1 peptides and development of new medicinal leads with protein kinase C isozyme and C1 domain selectivity. *Pharmacol. Ther.* 93, 271-281.
- Irie, K., Olie, K., Nakahara, A., Yanai, Y., Ohigashi, H., Wender, P.A., Fukuda, H., Konishi, H. y Kikkawa, U. (1998). Molecular basis of

- protein kinase C isozyme-selective binding: the synthesis, folding, and forbol ester binding of cysteine-rich domains of all protein kinase C isozymes. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 9159-9167.
- Ish-Horowicz, D. y Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Research* 9, 2989-2998.
- Ivaska, J., Bosca, L. y Parker, P.J. (2003). PKCepsilon is a permissive link in integrin-dependent IFN-gamma signalling that facilitates JAK phosphorylation of STAT1. *Nat. Cell Biol.* 5, 363-369.
- Ivaska, J., Whelan, R.D.H., Watson, R. y Parker, P.J. (2002). PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO J.* 21, 3608-3619.
- Izumi, Y., Hirose, T., Tamai, Y., Hirai, S., Nagashima, Y., Fujimoto, T., Tabuse, Y., Kempfues, K.J. y Ohno, S. (1998). An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J. Cell. Biol.* 143, 95-106.
- Jackson, M.B. (1976). A beta-coupled gauche kink description of the lipid bilayer phase transition. *Biochemistry* 15, 2555-2561.
- Jaken, S. (1996). Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 168-173.
- Jaken, S. y Parker, P.J. (2000). Protein kinase C binding partners. *BioEssays* 22, 245-254.
- Jarpe, M.B., Leach, K.L. y Raben, D.M. (1994). Alpha-thrombin-induced nuclear sn-1,2-diacylglycerols are derived from phosphatidylcholine hydrolysis in cultured fibroblasts. *Biochemistry* 33, 526-534.
- Jiménez-Monreal, A.M., Aranda, F.J., Micol, V., Sánchez-Piñera, P., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J.C. (1999). Influence of the physical state of the membrane on the enzymatic activity and energy of activation of protein kinase C alpha. *Biochemistry* 38, 7747-7754.
- Jo, E. y Boggs, J.M. (1995). Aggregation of acidic lipid vesicles by myelin basic protein: dependence on potassium concentration. *Biochemistry* 34, 13705-13716.

- Johannes, F.J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P. y Pfizenmain, K. (1994). PKCu is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 269, 6140-6148.
- Johnson, J.E., Giorgione, J. y Newton, A.C. (2000). The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specificity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry* 39, 11360-11369.
- Johnson, L., Gray, M., Chen, C.H. y Mochly-Rosen, D. (1996). A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function. *J. Biol. Chem.* 271, 24962-24966.
- Johnson, L.N. y Lewis, R.J. (2001). Structural basis for control by phosphorylation. *Chem Rev.* 101, 2209-2242.
- Joseloff, E., Cataisson, C., Aamodt, H., Ocheni, H., Blumberg, P., Kraker, A.J. y Yuspa, S.H. (2002). Src family kinases phosphorylate protein kinase C delta on tyrosine residues and modify the neoplastic phenotype of skin keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 12318-12323.
- Jung, Y.S., Ryu, B.R., Lee, B.K., Mook-Jung, I., Kim, S.U., Lee, S.H., Baik, E.J. y Moon C.H. (2004). Role for PKC-epsilon in neuronal death induced by oxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 789-794.
- Kaibuchi, K., Takai, Y., Sawamura, M., Hoshijima, M., Fujikura, T. y Nishizuka, Y. (1983). Synergistic functions of protein phosphorylation and calcium mobilization in platelet activation. *J. Biol. Chem.* 258, 6701-6704.
- Kampfer, S., Hellbert, K., Villunger, A., Doppler, W., Baier, G., Grunicke, H.H. y Uberall, F. (1998). Transcriptional activation of c-fos by oncogenic Ha-Ras in mouse mammary epithelial cells requires the combined activities of PKC-lambda, epsilon and zeta. *EMBO J.* 15, 4046-4055.
- Kanoh, H., Yamada, K. y Sakane, F. (2002). Diacylglycerol kinases: emerging downstream regulators in cell signaling systems. *J. Biochem.* 131, 629-633.

- Kashiwagi K., Shirai, Y., Kuriyama, M., Sakai, N. y Saito, N. (2002). Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 277, 18037-18045.
- Katan, M. y Allen, V.L. (1999). Modular PH and C2 domains in membrane attachment and other functions. *FEBS Lett.* 452, 36-40.
- Kauppinen, J.K., Moffatt, D.J., Mantsch, H.H. y Cameron, D.G. (1981). *Appl. Spectrosc.* 35, 271-276.
- Kazanietz, M.G., Lewin, N.E., Gao, F., Pettit, G.R. y Blumberg, P.M. (1994). Binding of [26-3H]bryostatin 1 and analogs to calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol. Pharmacol.* 46, 374-379.
- Kemp, B.E. y Pearson, R.B. (1990). Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci.* 15, 342-346.
- Keränen, L.M. y Newton A.C. (1997). Ca²⁺ differentially regulates conventional protein kinase Cs' membrane interaction and activation. *J. Biol. Chem.* 272, 25959-25967.
- Keränen, L.M., Dutil, E.M. y Newton, A.C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr.Biol.* 5, 1394-1403.
- Khan, W.A., Blobe, G.C. y Hannun, Y.A. (1995). Arachidonic acid and free fatty acids as second messengers and the role of protein kinase C. *Cell. Signal.* 7, 171-184.
- Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1986). The role of protein kinase C in transmembrane signalling. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2, 149-178.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Miyake, R. y Nishizuka, Y. (1983). Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 258, 11442-11445.
- Kiley, S. y Parker, P.J. (1995). Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 108, 1003-1016.

- Kishimoto, A., Takai, Y., Mori, T., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* 255, 2273-2276.
- Kitagawa, Y., Matsuo, Y., Minowada, J. y Nishizuka, Y. (1991). Protein kinase C of a human megakaryoblastic leukemic cell line (MEG-01). Analysis of subspecies and activation by diacylglycerol and free fatty acids. *FEBS Letters* 288, 37-40.
- Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. y Sowadski, J.M. (1991). Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253, 407-414.
- Kohout, S.C., Corbalán-García, S., Gómez-Fernández, J.C. y Falke, J.J. (2003). C2 domain of protein kinase C alpha: elucidation of the membrane docking surface by site-directed fluorescence and spin labeling. *Biochemistry* 42, 1254-1265.
- Kohout, S.C., Corbalán-García, S., Torrecillas, A., Gómez-Fernández, J.C. y Falke, J.J. (2002). C2 domains of protein kinase C isoforms alpha, beta, and gamma: activation parameters and calcium stoichiometries of the membrane-bound state. *Biochemistry* 41, 11411-11424.
- Konig, B., DiNitto, P.A. y Blumberg, P.M. (1985). Stoichiometric binding of diacylglycerol to the phorbol ester receptor. *J. Cell. Biochem.* 29, 37-44.
- Kooijman, E.E., Carter, K.M., van Laar, E.G., Chupin, V., Burger, K.N. y de Kruijff, B. (2005). What makes the bioactive lipids phosphatidic acid and lysophosphatidic acid so special?. *Biochemistry* 44, 17007-17015.
- Koreh, K. y Monaco, M.E. (1986). The relationship of hormone-sensitive and hormone-insensitive phosphatidylinositol to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the WRK-1 cell. *J. Biol. Chem.* 261, 88-91.
- Krimm, S. y Bandekar, J. (1986). Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein. Chem.* 38, 181-364.

- Krimm, S. y Bandekar, J., (1980). Vibrational analysis of peptides, polypeptides, and proteins. V. Normal vibrations of beta-turns. *Biopolymers* 19, 1-29.
- Kuksis, A., Myher, J.J., Geher, K., Hoffman, A.G., Breckenridge, W.C., Jones, G.J. y Little, J.A. (1978). Comparative determination of plasma cholesterol and triacylglycerol levels by automated gas-liquid chromatographic and autoanalyzer methods. *J. Chromatogr.* 146, 393-421.
- Kuksis, A., Myher, J.J., Marai, L. y Geher, K. (1975). Determination of plasma lipid profiles by automated gas chromatography and computerized data analysis. *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). Protein-protein interaction of zinc finger LIM domains with protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 271, 31029-31032.
- Kwon, O.J., Gainer, H., Wray, S. y Chin, H. (1996). Identification of a novel protein containing two C2 domains selectively expressed in the rat brain and kidney. *FEBS Lett.* 378, 135-139.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lakowicz, J.R. (1983) "*Principles of Fluorescence Spectroscopy*" Plenum Publishing Corporation, New York.
- Laroche, G., Dufourc, E.J., Dufourcq, J. y Pezolet, M. (1991). Structure and dynamics of dimyristoylphosphatidic acid/calcium complexes by ²H NMR, infrared, spectroscopies and small-angle x-ray diffraction. *Biochemistry* 30, 3105-3114.
- Lassegue, B., Alexander, R.W., Clark, M., Akers, M. y Griendling, K.K. (1993). Phosphatidylcholine is a major source of phosphatidic acid and diacylglycerol in angiotensin II-stimulated vascular smooth-muscle cells. *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). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042-2045.
- Lee, A.G. (1975). Segregation of chlorophyll a incorporated into lipid bilayers. *Biochemistry* 14, 4397-4402.
- Lee, C., Fisher, S.K., Agranoff, B.W. y Hajra, A.K. (1991). Quantitative analysis of molecular species of diacylglycerol and phosphatidate formed upon muscarinic receptor activation of human SK-N-SH neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 266, 22837-22846.
- Lee, H.W., Smith, L., Pettit, G.R. y Smith, J.B. (1997). Bryostatin 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C-alpha and -epsilon via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* 51, 439-447.
- Lee, M.H. y Bell, R.M. (1989). Phospholipid functional groups involved in protein kinase C activation, phorbol ester binding, and binding to mixed micelles. *J. Biol. Chem.* 264, 14797-14805.
- Lee, M.H. y Bell, R.M. (1991). Mechanism of protein kinase C activation by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 30, 1041-1049.
- Lehel, C., Olah, Z., Jakab, G., Szallasi, Z., Petrovics, G., Harta, G., Blumberg, P.M. y Anderson, W.B. (1995). Protein kinase C epsilon subcellular localization domains and proteolytic degradation sites. A model for protein kinase C conformational changes. *J. Biol. Chem.* 270, 19651-19658.
- Lehel, C., Olah, Z., Mischack, H., Mushinski, J.F. y Anderson, W.B. (1994). Overexpressed protein kinase C-delta and -epsilon subtypes in NIH 3T3 cells exhibit differential subcellular localization and differential regulation of sodium-dependent phosphate uptake. *J. Biol. Chem.* 269, 4761-4766.
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* 4, 201-213.
- Lemmon, M.A., Ferguson, K.M., O'Brien, R., Sigler, P.B. y Schlessinger, J. (1995). Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an

- isolated pleckstrin homology domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 10472-10476.
- Lenardo, M.J. y Baltimore, D. (1989). NF- κ B: a pleiotropic mediator of inducible tissue-specific gene control. *Cell* 58, 227-229.
- Lester, D.S., Doll, L., Brumfeld, V. y Miller, I.R. (1990). Lipid dependence of surface conformations of protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta* 1039, 33-41.
- Leventhal, P.S. y Bertics, P.J. (1993). Activation of protein kinase C by selective binding of arginine-rich polypeptides. *J. Biol. Chem.* 268, 13906-13913.
- Lewis, R.N., McElhaney, R.N., Pohle, W. y Mantsch, H.H. (1994). Components of the carbonyl stretching band in the infrared spectra of hydrated 1,2-diacylglycerolipid bilayers: a reevaluation. *Biophys. J.* 67, 2367-2375.
- Li, L., Shin, O., Rhee, J., Arac, D., Rah, J., Rizo, J., Sudhof, T.C. y Rosenmund, C. (2006). Phosphatidylinositol phosphates as co-activators of Ca²⁺ binding to C2 domains of synaptotagmin 1. *J. Biol. Chem.* 281, 5845-5852.
- Liedtke, C.M., Yun, C.H.C., Kyle, N. y Wang, D. (2002). Protein kinase C epsilon-dependent regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator involves binding to a receptor for activated C kinase (RACK1) and RACK1 binding to Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor. *J. Biol. Chem.* 277, 22925-22933.
- Limatola, C., Schaap, D., Moolenaar, W.H. y van Blitterswijk, W.J. (1994). Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isoforms and other acidic lipids. *Biochem. J.* 304, 1001-1008.
- Lindström, F., Williamson, P.T.F., y Gröbner, G. (2005). Molecular insight into the electrostatic membrane surface potential by ¹⁴N/³¹P MAS NMR spectroscopy: nociceptin-lipid association. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 6610-6616.
- Littler, D.R., Walker, J.R., She, Y.M., Finerty, P.J., Newman, E.M. y Dhe-Paganon, S. (2006). Structure of human protein kinase C ϵ

- (PKCeta) C2 domain and identification of phosphorylation sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 349, 1182-1189.
- Liu, G., Cohen, M., Mochly-Rosen, D. y Downey, J. (1999). Protein kinase C-epsilon is responsible for the protection of preconditioning in rabbit cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 31, 1937-1948.
- Liu, L., Song, X., He, D., Komma, C., Kita, A., Virbasius, J.V., Huang, G., Bellamy, H.D., Miki, K., Czech, M.P. y Zhou, G.W. (2006). Crystal structure of the C2 domain of class II phosphatidylinositide 3-kinase C2alpha. *J. Biol. Chem.* 281, 4254-4260.
- Liu, Y., Graham, C., Li, A., Fisher, R.J. y Shaw, S. (2002). Phosphorylation of the protein kinase C-theta activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to in vivo nuclear-factor-kappaB induction. *Biochem. J.* 361, 255-265.
- López-Andreo, M., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2003). The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase Cepsilon to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol. Biol. Cell.* 14, 4885-4895.
- López-Andreo, M.J., Torrecillas, A., Conesa-Zamora, P., Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J.C. (2005). Retinoic acid as a modulator of the activity of protein kinase Calpha. *Biochemistry* 44, 11353-11360.
- López-García, F., Villalaín, J., Gómez-Fernández, J.C. y Quinn, P.J. (1994). The phase behavior of mixed aqueous dispersions of dipalmitoyl derivatives of phosphatidylcholine and diacylglycerol. *Biophys. J.* 66, 1991-2004.
- López-Nicolás, R., López-Andreo, M.J., Marín-Vicente, C., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2006). Molecular mechanisms of PKCalpha localization and activation by arachidonic acid. The C2 domain also plays a role. *J. Mol. Biol.* 357, 1105-1120.
- Lu, Z., Liu, D., Hornia, A., Devonish, W., Pagano, M. y Foster, D.A. (1998). Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell Biol.* 18, 839-845.

- Luzzati, V. (1968) *Biological membranes: Physical fact and function* (D. Chapman, ed.) 1, 71-123. Academic Press, London.
- Mackay, H.J. y Twelves, C.J. (2003). Protein kinase C: a target for anticancer drugs?. *Endocrin. Relat. Cancer* 10, 389-396.
- MacNaughtan, W., Snook, K.A., Caspi, E. y Franks, N.P. (1985). An X-ray diffraction analysis of oriented lipid multilayers containing basic proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 818, 132-148.
- Magtoto, N.P., Sefara, N.L. y Richardson, H.H. (1999) *Appl. Spectrosc.* 53, 178-183.
- Makhlouf, G.M. y Murthy, K.S. (1997). Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell. Signal.* 9, 269-276.
- Makowske, M. y Rosen, O.M. (1989). Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. *J. Biol. Chem.* 264, 16155-16159.
- Malhotra, A., Begley, R., Kang, B.P., Rana, I., Liu, J., Yang, G., Mochly-Rosen, D. y Meggs, L.G. (2005). PKC ϵ -dependent survival signals in diabetic hearts. *Am. J. Physiol.* 289, 1343-1350.
- Mantsch, H.H. y McElhaney, R.N. (1991). Phospholipid phase transitions in model and biological membranes as studied by infrared spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 57, 213-226.
- Mantsch, H.H., Perczel, A., Hollosi, M. y Fasman, G.D. (1993). Characterization of beta-turns in cyclic hexapeptides in solution by Fourier transform IR spectroscopy. *Biopolymers* 33, 207-210.
- Marais, R. y Marshall, C.J. (1996). Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer Surv.* 27, 101-125.
- Marcott, C., Dowrey, A.E. y Noda, I. (1994). *Anal. Chem.* 66, 1065A-1075A.
- Marignani, P.A., Epand, R.M. y Sebaldt, R.J. (1996). Acyl chain dependence of diacylglycerol activation of protein kinase C activity in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225, 469-473.

- Marín-Vicente, C., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2005). The ATP-dependent membrane localization of protein kinase Calpha is regulated by Ca²⁺ influx and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in differentiated PC12 cells. *Mol. Biol. Cell* 16, 2848-2861.
- Martínez-Senac, M.d.M., Villalain, J. y Gómez-Fernández, J.C. (1999). Structure of the Alzheimer beta-amyloid peptide (25-35) and its interaction with negatively charged phospholipid vesicles. *Eur. J. Biochem.* 265, 744-753.
- McClure, W.L., Maeda, H., Dong, J., Liu, Y. y Ozaki, Y. (1996) *Appl. Spectrosc.* 50, 467-475.
- McLaughlin, S. (1989). The electrostatic properties of membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18, 113-136.
- McLaughlin, S. y Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* 438, 605-611.
- McLaughlin, S., Hangyas-Mihalyne, G., Zaitseva, I. y Golebiewska, U. (2005). Reversible - through calmodulin - electrostatic interactions between basic residues on proteins and acidic lipids in the plasma membrane. *Biochem. Soc. Symp.* 72, 189-198.
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A. y Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31, 151-175.
- Medkova, M. y Cho, W. (1998a). Mutagenesis of the C2 domain of protein kinase C-alpha. Differential roles of Ca²⁺ ligands and membrane binding residues. *J. Biol. Chem.* 273, 17544-17552.
- Medkova, M. y Cho, W. (1998b). Differential membrane-binding and activation mechanisms of protein kinase C-alpha and -epsilon. *Biochemistry* 37, 4892-4900.
- Medkova, M. y Cho, W. (1999). Interplay of C1 and C2 domains of protein kinase C-alpha in its membrane binding and activation. *J. Biol. Chem.* 274, 19852-19861.

- Mellor, H. y Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* 332, 281-292.
- Messerschmidt, A., Macieira, S., Velarde, M., Bädeker, M., Benda, C., Jestel, A., Brandstetter, H., Neufeind, T. y Blaesse, M. (2005). Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C- ι reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. *J. Mol. Biol.* 352, 918-931.
- Micol, V., Sánchez-Piñera, P., Villalaín, J., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J.C. (1999). Correlation between protein kinase C α activity and membrane phase behavior. *Biophys. J.* 76, 916-927.
- Miick, S.M., Martínez, G.V., Fiori, W.R., Todd, A.P. y Millhauser, G.L. (1992). Short alanine-based peptides may form 3(10)-helices and not α -helices in aqueous solution. *Nature* 359, 653-655.
- Miyazawa, T., Shimanouchi, T. y Mizushima, T. (1958). *J. Chem. Phys.* 29, 611-615.
- Mochly-Rosen, D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: A theme in signal transduction. *Science* 268, 247-251.
- Mochly-Rosen, D. y Gordon, A.S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.* 12, 35-42.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H. y López, J. (1991a). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 3997-4000.
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., López, J. y Smith, B. L. (1991b). Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme. *J. Biol. Chem.* 266, 14866-14868.
- Mochly-Rosen, D., Miller, K.G., Scheller, R.H., Khaner, H., Lopez, J., y Smith, B.L. (1992). p65 fragments, homologous to the C2 region of protein kinase C, bind to the intracellular receptors for protein kinase C. *Biochemistry* 31, 8120-8124.
- Mori, T., Takai, Y., Yu, B., Takahashi, J., Nishizuka, Y. y Fujimura, T. (1982). Specificity of the fatty acyl moieties of diacylglycerol for the

- activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase. *J. Biochem.* 91, 427-431.
- Moscat, J. y Díaz-Meco, M. (2000). The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep.* 1, 399-403.
- Moscat, J., Rennert, P. y Díaz-Meco, M. (2006). PKCzeta at the crossroad of NF-kappaB and Jak1/Stat6 signaling pathways. *Cell Death Differ.* 13, 702-711.
- Mosior, M. y Epanand, R.M. (1993). Mechanism of activation of protein kinase C: roles of diolein and phosphatidylserine. *Biochemistry* 32, 66-75.
- Mosior, M. y McLaughlin, S. (1991). Peptides that mimic the pseudosubstrate region of protein kinase C bind to acidic lipids in membranes. *Biophys. J.* 60, 149-159.
- Mosior, M. y Newton, A.C. (1996). Calcium-independent binding to interfacial phorbol esters causes protein kinase C to associate with membranes in the absence of acidic lipids. *Biochemistry* 35, 1612-1623.
- Mott, H.R., Carpenter, J.W., Zhong, S., Ghosh, S., Bell, R.M. y Campbell, S.L. (1996). The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8312-8317.
- Mouro, C., Jung, C., Bondon, A. y Simonneaux, G. (1997). Comparative Fourier transform infrared studies of the secondary structure and the CO heme ligand environment in cytochrome P-450cam and cytochrome P-420cam. *Biochemistry* 36, 8125-8134.
- Muga, A., Arrondo, J.L., Bellon, T., Sancho, J., y Bernabeu, C. (1993). Structural and functional studies on the interaction of sodium dodecyl sulfate with beta-galactosidase. *Archiv. Biochem. Biophys.* 300, 451-457.
- Mukai, H. y Ono, Y. (1994). A novel protein kinase with leucine zipper-like sequences: its catalytic domain is highly homologous to that of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 897-904.

- Muller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D. y Pfizenmaier, K. (1995). PKC zeta is a molecular switch in signal transduction of TNF-alpha, bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.* 14, 1961-1969.
- Murray, D. y Honig, B. (2002). Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. *Mol. Cell* 9, 145-154.
- Murthy, K.S. y Makhlof, G.M. (1995). Agonist-mediated activation of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and D in intestinal smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* 48, 293-304.
- Myat, M.M., Anderson, S., Allen, L.A. y Aderem, A. (1997). MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Curr. Biol.* 7, 611-614.
- Nabet, A., Boggs, J.M. y Pezolet, M. (1994). Study by infrared spectroscopy of the interaction of bovine myelin basic protein with phosphatidic acid. *Biochemistry* 33, 14792-14799.
- Nahorski, S.R., Young, K.W., John Challiss, R.A. y Nash, M.S. (2003). Visualizing phosphoinositide signalling in single neurons gets a green light. *Trends Neurosci.* 26, 444-452.
- Nakanishi, H., Brewer, K.A. y Exton, J.H. (1993). Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268, 13-16.
- Nalefski, E.A. y Falke, J.J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein. Sci.* 5, 2375-2390.
- Nalefski, E.A. y Newton, A.C. (2001). Membrane binding kinetics of protein kinase C betaII mediated by the C2 domain. *Biochemistry* 40, 13216-13229.
- Nalefski, E.A., Slazas, M.M. y Falke, J.J. (1997). Ca²⁺-signaling cycle of a membrane-docking C2 domain. *Biochemistry* 36, 12011-12018.
- Narumiya, S., Ishizaki, T. y Watanabe, N. (1997). Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 410, 68-72.

- Newton, A.C. (1993). Interaction of proteins with lipid headgroups: lessons from protein kinase C. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 21-25.
- Newton, A.C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28498.
- Newton, A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9, 161-167.
- Newton, A.C. (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem. Rev.* 101, 2353-2364.
- Newton, A.C. (2003). Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 370, 361-371.
- Newton, A.C. y Johnson, J.E. (1998). Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 155-172.
- Newton, A.C. y Keranen, L.M. (1994). Phosphatidyl-L-serine is necessary for protein kinase C's high-affinity interaction with diacylglycerol-containing membranes. *Biochemistry* 33, 6651-6658.
- Nishikawa, K., Toker, A., Johannes, F.J., Songyang, Z. y Cantley, L.C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272, 952-960.
- Nishizuka, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308, 693-698.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305-312.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.
- Nishizuka, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-496.

- Noda, I. (1989). *J. Am. Chem. Society* 111, 8116-8118.
- 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.
- O'Flaherty, J.T., Chadwell, B.A., Kearns, M.W., Sergeant, S. y Daniel, L.W. (2001). Protein kinases C translocation responses to low concentrations of arachidonic acid. *J. Biol. Chem.* 276, 24743-24750.
- Oancea, E. y Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 95, 307-318.
- Oancea, E., Teruel, M.N., Quest, A.F.G. y Meyer, T. (1998). Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J. Cell Biol.* 140, 485-498.
- Ochoa, W.F., Corbalán-García, S., Eritja, R, Rodríguez-Alfaro, J.A., Gómez-Fernández, J.C., Fita, I. y Verdaguer, N. (2002). Additional binding sites for anionic phospholipids and calcium ions in the crystal structures of complexes of the C2 domain of protein kinase calpha. *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). Structure of the C2 domain from novel protein kinase Cepsilon. A membrane binding model for Ca²⁺-independent C2 domains. *J. Mol. Biol.* 311, 837-849.
- Ochoa, W.F., Torrecillas, A., Fita, I., Verdaguer, N., Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J.C. (2003). Retinoic acid binds to the C2-domain of protein kinase C(alpha). *Biochemistry* 42, 8774-8779.
- Ohno, S. y Nishizuka, Y. (2002). Protein kinase C isoforms and their specific functions: prologue. *J. Biochem.* 132, 509-511.
- Ohno, S., Konno, Y., Akita, Y., Yano, A. y Suzuki, K. (1990). point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alpha abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. A

- molecular link between autophosphorylation and down-regulation. *J. Biol. Chem.* 265, 6296-6300.
- Oldfield, E., Bowers, J.L. y Forbes, J. (1987). High-resolution proton and carbon-13 NMR of membranes: why sonicate?. *Biochemistry* 26, 6919-6923.
- Olivier, A.R. y Parker, P.J. (1991). Expression and characterization of protein kinase C-delta. *Eur. J. Biochem.* 200, 805-810.
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kikkawa, U., Ogita, K. y Nishizuka, Y. (1988a). Nucleotide sequences of cDNAs for alpha and gamma subspecies of rat brain protein kinase C. *Nucleic Acids Res.* 16, 5199-5200.
- Ono, Y., Fujii, T., Igarashi, K., Kino, C., Tanaka, U., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1989a). Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 86, 4868-4871.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. (1988b). The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* 263, 6927-6932.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. (1987a). Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS Lett.* 226, 125-128.
- Ono, Y., Kikkawa, U., Ogita, K., Fujii, T., Kurokawa, T., Asaoka, Y., Sekiguchi, K., Ase, K., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. (1987b). Expression and properties of two types of protein kinase C: alternative splicing from a single gene. *Science* 236, 1116-1120.
- Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. y Nishizuka, Y. (1989b). Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 3099-3103.

- Orr, J.W. y Newton, A.C. (1994a). Intrapeptide regulation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269, 8383-8387.
- Orr, J.W. y Newton, A.C. (1994b). Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 269, 27715-27718.
- Orr, J.W., Keranen, L.M. y Newton, A.C. (1992). Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 267, 15263-15266.
- Orr, W. y Newton, A.C. (1992). Interaction of protein kinase C with phosphatidylserine. 2. Specificity and regulation. *Biochemistry* 31, 4667-4673.
- Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T. y Ohno, S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* 265, 22434-22440.
- Osada, S.I., Mizuno, K., Saido, T.C., Suzuki, K., Kuroki, T. y Onho, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3930-3938.
- Ozaki, Y., Liu, Y. y Noda, I. (1997) *Appl. Spectrosc.* 51, 526-537.
- Palmer, R.H., Ridden, J. y Parker, P.J. (1994). Identification of multiple, novel, protein kinase C-related gene products. *FEBS Lett.* 356, 5-8.
- Pappa, H., Murray-Rust, J., Dekker, L.V., Parker, P.J. y McDonald, N.Q. (1998). Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure* 6, 885-894.
- Parekh, D.B., Wolfgang, Z. y Parker, P.J. (2000). Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* 19, 496-503.
- Parker, P.J. (1999). Inhibition of protein kinase C--do we, can we, and should we?. *Pharmacol. Ther.* 82, 263-267.

- Parker, P.J. (2004). The ubiquitous phosphoinositides. *Biochem. Soc. Trans.* 320, 893-898.
- Pears, C.J., Kour, G., House, C., Kemp, B.E. y Parker, P.J. (1990). Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *Eur. J. Biochem.* 194, 89-94.
- Pears, C.J., Schaap, D. y Parker, P.J. (1991). The regulatory domain of protein kinase C-epsilon restricts the catalytic-domain-specificity. *Biochem. J.* 276, 257-260.
- Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, R. y Südhof, T.C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345, 260-263.
- Perisic, O., Fong, S., Lynch, D.E., Bycroft, M. y Williams, R.L. (1998). Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 273, 1596-1604.
- Pfeffer, L.M., Eisenkraft, B.L., Reich, N.C., Improta, T., Baxter, G., Daniel, S., Issakani, S. y Strulovici, B. (1991). Transmembrane signaling by interferon alpha involves diacylglycerol production and activation of the epsilon isoform of protein kinase C in Daudi cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7988-7992.
- Pinheiro, T.J. y Watts, A. (1994a). Lipid specificity in the interaction of cytochrome c with anionic phospholipid bilayers revealed by solid-state ^{31}P NMR. *Biochemistry* 33, 2451-2458.
- Pinheiro, T.J. y Watts, A. (1994b). Resolution of individual lipids in mixed phospholipid membranes and specific lipid-cytochrome c interactions by magic-angle spinning solid-state phosphorus-31 NMR. *Biochemistry* 33, 2459-2467.
- Ponting, C., Ito, T., Moscat, J., Diaz-Meco, M., Inagaki, F. y Sumimoto, H. (2002). OPR, PC and AID: all in the PB1 family. *Trends Biochem. Sci.* 27, 10.
- Portis, A., Newton, A.C., Pangborn, W. y Papahadjopoulos, D. (1979). Studies on the mechanism of membrane fusion: evidence for an

- intermembrane Ca^{2+} -phospholipid complex, synergism with Mg^{2+} , and inhibition by spectrin. *Biochemistry* 18, 780-790.
- Powell, J.R., Wasacz, F.M. y Jakobsen, R.J. (1986). *Appl. Spectrosc.* 40, 339-344.
- Prekeris, R., Hernández, R.M., Mayhew, M.W., White, M.K. y Terrian, D.M. (1998). Molecular analysis of the interactions between protein kinase C-epsilon and filamentous actin. *J. Biol. Chem.* 273, 26790-26798.
- Prekeris, R., Mayhew, M.W., Cooper, J.B. y Terrian, D.M. (1996). Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *J. Cell. Biol.* 132, 77-90.
- Prestrelski, S.J., Byler, D.M. y Thompson, M.P. (1991). Infrared spectroscopic discrimination between alpha- and 3(10)-helices in globular proteins. Reexamination of Amide I infrared bands of alpha-lactalbumin and their assignment to secondary structures. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 37, 508-512.
- Quest, A.F. y Bell, R.M. (1994). The regulatory region of protein kinase C gamma. Studies of phorbol ester binding to individual and combined functional segments expressed as glutathione S-transferase fusion proteins indicate a complex mechanism of regulation by phospholipids, phorbol esters, and divalent cations. *J. Biol. Chem.* 269, 20000-20012.
- Quest, A.F., Bloomenthal, J., Bardes, E.S.G. y Bell, R. M. (1992). The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc. *J. Biol. Chem.* 267, 10193-10197.
- Radomska-Pandya, A., Chen, G., Czernik, P.J., Little, J.M., Samokyszyn, V.M., Carter, C.A. y Nowak, G. (2000). Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J. Biol. Chem.* 275, 22324-22330.
- Rando, R.R. y Kishi, Y. (1992). Structural basis of protein kinase C activation by diacylglycerols and tumor promoters. *Biochemistry* 31, 2211-2218.

- Rebecchi, M., Peterson, A. y McLaughlin, S. (1992). Phosphoinositide-specific phospholipase C-delta 1 binds with high affinity to phospholipid vesicles containing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 31, 12742-12747.
- Rebecchi, M.J. y Pentylala, S.N. (2000). Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol. Rev.* 80, 1291-1335.
- Reisdorf, C., Abergel, D., Bontems, F., Lallemand, J.Y., Decottignies, J.P. y Spik, G. (1994). Proton resonance assignments and secondary structure of bovine angiogenin. *Eur. J. Biochem.* 224, 811-822.
- Reisdorf, W.C. y Krimm, S. (1996). Infrared amide I' band of the coiled coil. *Biochemistry* 35, 1383-1386.
- Rietveld, A., Berkhout, T.A., Roenhorst, A., Marsh, D. y de Kruijff, B. (1986). Preferential association of apocytochrome c with negatively charged phospholipids in mixed model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 858, 38-46.
- Rizo, J. y Sudhof, T.C. (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J. Biol. Chem.* 273, 15879-15882.
- Roberts, M.F. (1996). Phospholipases: structural and functional motifs for working at an interface. *FASEB J.* 10, 1159-1172.
- Rodríguez-Alfaro, J.A., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2004). Role of the lysine-rich cluster of the C2 domain in the phosphatidylserine-dependent activation of PKC α . *J. Mol. Biol.* 335, 1117-1129.
- Ron, D. y Kazanietz, M.G. (1999). New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB J.* 13, 1658-1676.
- Ron, D. y Mochly-Rosen, D. (1995). An autoregulatory region in protein kinase C: the pseudoanchoring site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 492-496.

- Rosenbaum, S.E. y Niles, R.M. (1992). Regulation of protein kinase C gene expression by retinoic acid in B16 mouse melanoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 294, 123-129.
- Roth, M.G. (2004). Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol. Rev.* 84, 699-730.
- Rothschild, K.J. y Clark, N.A. (1979). Anomalous amide I infrared absorption of purple membrane. *Science* 204, 311-312.
- Rytomaa, M. y Kinnunen, P.K.J. (1995). Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 270, 3197-3202.
- Saba, R.I., Ruyschaert, J.M., Herschuelz, A. y Goormaghtigh, E. (1999). Fourier transform infrared spectroscopy study of the secondary and tertiary structure of the reconstituted Na⁺/Ca²⁺ exchanger 70-kDa polypeptide. *J. Biol. Chem.* 274, 15510-15518.
- Saiki, R.K., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 235, 487-491.
- Sánchez-Bautista, S., Marín-Vicente, C., Gómez-Fernández, J.C. y Corbalán-García, S. (2006). The C2 domain of PKC α is a Ca²⁺ - dependent PtdIns(4,5)P₂ sensing domain: a new insight into an old pathway. *J. Mol. Biol.* 362, 901-914.
- Sánchez-Piñera, P., Aranda, F.J., Micol, V., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J.C. (1999b). Modulation of polymorphic properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine by the antineoplastic ether lipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-glycero-3-phosphocholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1417, 202-210.
- Sánchez-Piñera, P., Micol, V., Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J.C. (1999a). A comparative study of the activation of protein kinase C α by different diacylglycerol isomers. *Biochem. J.* 337, 387-395.
- Sanders, K.M. y Hunter, K. (1988) *Modern NMR Spectroscopy*, Oxford University Press. Oxford.

- Sanz, L., Sánchez, P., Lallena, M.J., Díaz-Meco, M.T. y Moscat, J. (1999). The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *EMBO J* 18, 3044–3053.
- Sato, S., Fujita, N. y Tsuruo, T. (2000). Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 10832–10837.
- Schaap, D. y Parker, P.J. (1990). Expression, purification, and characterization of protein kinase C-epsilon. *J. Biol. Chem.* 265, 7301-7307.
- Schaap, D., Hsuan, J., Totty, N. y Parker, P.J. (1990). Proteolytic activation of protein kinase C-epsilon. *Eur. J. Biochem.* 191, 431-435.
- Schachter, J.B., Lester, D.S. y Alkon, D.L. (1996). Synergistic activation of protein kinase C by arachidonic acid and diacylglycerols in vitro: generation of a stable membrane-bound, cofactor-independent state of protein kinase C activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1291, 167-176.
- Schechtman, D., Craske, M.L., Kheifets, V., Meyer, T., Schechtman, J. y Mochly-Rosen, D. (2004). A critical intramolecular interaction for protein kinase Cepsilon translocation. *J. Biol. Chem.* 279, 15831-15840.
- Schindler, H. y Seelig, J. (1975). Deuterium order parameters in relation to thermodynamic properties of a phospholipid bilayer. A statistical mechanical interpretation. *Biochemistry* 14, 2283-2287.
- Schonwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J. y Parker, P.J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell Biol.* 18, 790-798.
- Schultz, A., Jonsson, J.I. y Larsson, C. (2003). The regulatory domain of protein kinase Ctheta localises to the Golgi complex and induces apoptosis in neuroblastoma and Jurkat cells. *Cell Death Differ.* 10, 662-675.
- Seelig, J., Tamm, L., Hymel, L. y Fleischer, S. (1981). ³¹P and ²H NMR studies of structure and motion in bilayers of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Biochemistry* 20, 3922-3932.

- Selbie, L.A., Schmitz-Peiffer, C., Sheng, Y. y Biden, T.J. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* 15, 24296–24302.
- Shao, X., Davletov, B.A., Sutton, R.B., Südhof, T.C. y Rizo, J. (1996). Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science* 273, 248-251.
- Shen, N., Guryev, O. y Rizo, J. (2005). Intramolecular occlusion of the diacylglycerol-binding site in the C1 domain of munc13-1. *Biochemistry* 44, 1089-1096.
- Shimanouchi, T., Tsuboi, M. y Kyogoku, Y. (1964) In *Advances in Chemical Physics* (Duchesne J, ed.), pp. 435–498. Wiley Interscience,
- Shin, O.H., Han, W., Wang, Y. y Südhof, T.C. (2005). Evolutionarily conserved multiple C2 domain proteins with two transmembrane regions (MCTPs) and unusual Ca²⁺ binding properties. *J. Biol. Chem.*, 280, 1641-1651.
- Shinomura, T., Asaoka, Y., Oka, M., Yoshida, K. y Nishizuka, Y. (1991). Synergistic action of diacylglycerol and unsaturated fatty acid for protein kinase C activation: its possible implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5149-5153.
- Shirai, Y., Kashiwagi, K., Yagi, K., Sakai, N. y Saito, N. (1998). Distinct effects of fatty acids on translocation of gamma- and epsilon-subspecies of protein kinase C. *J. Cell. Biol.* 143, 511-521.
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M. y Takai, Y. (1993). Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2061-2068.
- Singleton, S.F. y Xiao, J. (2002). The stretched DNA geometry of recombination and repair nucleoprotein filaments. *Biopolymers* 61, 145-158.

- Six, D.A. y Dennis, E.A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 1-19.
- Slater, S.J., Cox, K.J.A., Lombardi, J.V., Ho, C., Kelly, M.B., Rubin, E. y Stubbs, C.D. (1993). Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* 364, 82-84.
- Slater, S.J., Ho, C. y Stubbs, C.D. (2002). The use of fluorescent phorbol esters in studies of protein kinase C-membrane interactions. *Chem. Phys. Lipids* 116, 75-91.
- Slater, S.J., Ho, C., Kelly, M.B., Larkin, J.D., Taddeo, F.J., Yeager, M.D. y Stubbs, C.D. (1996). Protein kinase Calpha contains two activator binding sites that bind phorbol esters and diacylglycerols with opposite affinities. *J. Biol. Chem.* 271, 4627-4631.
- Slater, S.J., Kelly, M.B., Larkin, J.D., Ho, C., Mazurek, A., Taddeo, F.J., Yeager, M.D. y Stubbs, C.D. (1997). Interaction of alcohols and anesthetics with protein kinase Calpha. *J. Biol. Chem.* 272, 6167-6173.
- Slater, S.J., Seiz, J.L., Cook, A.C., Buzas, C.J., Malinowski, S.A., Kershner, J.L., Stagliano, B.A. y Stubbs, C.D. (2002). Regulation of PKC alpha activity by C1-C2 domain interactions. *J. Biol. Chem.* 277, 15277-15285.
- Slater, S.J., Taddeo, F.J., Mazurek, A., Stagliano, B.A., Milano, S.K., Kelly, M.B., Ho, C. y Stubbs, C.D. (1998). Inhibition of membrane lipid-independent protein kinase Calpha activity by phorbol esters, diacylglycerols, and bryostatin-1. *J. Biol. Chem.* 273, 23160-23168.
- 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. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- Smith, R., Cornell, B.A., Keniry, M.A. y Separovic, F. (1983). ³¹P nuclear magnetic resonance studies of the association of basic proteins with multilayers of diacyl phosphatidylserine *Biochim. Biophys. Acta* 732, 492-498.

- Soderling, T.R. (1990). Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains. *J. Biol. Chem.* 265, 1823-1826.
- Songyang, Z. y Cantley, L.C. (1995). Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.* 20, 470-475.
- Sonnenburg, E.D., Gao, T. y Newton, A.C. (2001). The phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1, phosphorylates conventional protein kinase C isozymes by a mechanism that is independent of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 45289-45297.
- Sossin, W.S. y Schwartz, J.H. (1993). Ca²⁺-independent protein kinase Cs contain an amino-terminal domain similar to the C2 consensus sequence. *Trends Biochem. Sci.* 18, 207-208.
- Spooner, P.J. y Watts, A. (1991). Reversible unfolding of cytochrome c upon interaction with cardiolipin bilayers. 2. Evidence from phosphorus-³¹ NMR measurements. *Biochemistry* 30, 3880-3885.
- Stahelin, R.V., Digman, M.A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Rafter, J.D., Melowic, H.R. y Cho, W. (2004). Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cdelta. *J. Biol. Chem.* 279, 29501-29512.
- Stahelin, R.V., Digman, M.A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Melowic, H.R., Rafter, J.D. y Cho, W. (2005). Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cepsilon: mechanistic differences between protein kinases Cdelta and Cepsilon. *J. Biol. Chem.* 280, 19784-19793.
- Standaert, M.L., Bandyopadhyay, G., Kanoh, Y., Sajan, M.P. y Farese, R.V. (2001). Insulin and PIP₃ activate PKC-zeta by mechanisms that are both dependent and independent of phosphorylation of activation loop (T410) and autophosphorylation (T560) sites. *Biochemistry* 40, 249-255.
- Stauffer, T.P., Ahn, S. y Meyer, T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P₂ concentration monitored in living cells. *Curr. Biol.* 8, 343-346.

- Stebbins, E.G. y Mochly-Rosen, D. (2001). Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 276, 29644-29650.
- Stephens, L.R., Jackson, T.R. y Hawkins, P.T. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system?. *Biochim. Biophys. Acta.* 1179, 27-75.
- Sudhof, T.C. (2002). Synaptotagmins: why so many?. *J. Biol. Chem.* 277, 7629-7632.
- Surewicz, W.K., Leddy, J.J. y Mantsch, H.H. (1990). Structure, stability, and receptor interaction of cholera toxin as studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* 29, 8106-8111.
- Susi, H. (1972). Infrared spectroscopy—conformation. *Methods Enzymol.* 26, 455-472.
- Susi, H., Timasheff, S.N. y Stevens, L. (1967). Infrared spectra and protein conformations in aqueous solutions. I. The amide I band in H₂O and D₂O solutions. *J. Biol. Chem.* 242, 5460-5466.
- Sutton, R.B. y Sprang, S.R. (1998). Structure of the protein kinase C beta phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca²⁺. *Structure* 6, 1395-1405.
- Sutton, R.B., Davletov, B.A., Berghuis, A.M., Südhof, T.C. y Sprang, S.R. (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* 80, 929-938.
- Swairjo, M.A., Concha, N.O., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. y Seaton, B.A. (1995). Ca²⁺-bridging mechanism and phospholipid head group recognition in the membrane-binding protein annexin V. *Nat. Struct. Biol.* 2, 968-974.
- Swairjo, M.A., Seaton, B.A. y Roberts, M.F. (1994). Effect of vesicle composition and curvature on the dissociation of phosphatidic acid in small unilamellar vesicles--a ³¹P-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* 1191, 354-361.

- Swannie, H.C. y Kaye, S.B. (2002). Protein kinase C inhibitors. *Curr. Oncol. Rep.* 4, 37-46.
- Szallasi, Z., Du, L., Levine, R., Lewin, N.E., Nguyen, P.N., Williams, M.D., Pettit, G.R. y Blumberg, P.M. (1996). The bryostatins inhibit growth of B16/F10 melanoma cells in vitro through a protein kinase C-independent mechanism: dissociation of activities using 26-epi-bryostatin 1. *Cancer Res.* 56, 2105-2111.
- Tabuse, Y., Izumi, Y., Piano, F., Kempfues, K.J., Miwa, J. y Ohno, S. (1998). Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 3607-3614.
- Tamm, L.K. y Seelig, J. (1983). Lipid solvation of cytochrome c oxidase. Deuterium, nitrogen-14, and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies on the phosphocholine head group and on cis-unsaturated fatty acyl chains. *Biochemistry* 22, 1474-1483.
- Tanaka, S., Tominaga, M., Yasuda, I., Kishimoto, A. y Nishizuka, Y. (1991). Protein kinase C in rat brain synaptosomes. Beta II-subspecies as a major isoform associated with membrane-skeleton elements. *FEBS Lett.* 294, 267-270.
- Taylor, S.S. y Radzio-Andzelm, E. (1994). Three protein kinase structures define a common motif. *Structure* 15, 345-355.
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. y Yonemoto, W. (1990). cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 971-1005.
- Testerink, C. y Munnik, T. (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant. Sci.* 10, 368-375.
- Thelen, M., Rosen, A., Nairn, A.C. y Aderem, A.A. (1991). Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 351, 320-322.
- Toker, A. (1998a). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 254-261.

- Toker, A. (1998b). Signaling through protein kinase C. *Front. Biosci.* 3, D1134-D1147.
- Torrecillas, A., Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J.C. (2003). Structural study of the C2 domains of the classical PKC isoenzymes using infrared spectroscopy and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Biochemistry* 42, 11669-11681.
- Torrecillas, A., Corbalán-García, S., de Godos, A. y Gómez-Fernández, J.C. (2001). Activation of protein kinase C alpha by lipid mixtures containing different proportions of diacylglycerols. *Biochemistry* 40, 15038-15046.
- Torrecillas, A., Láynez, J., Menéndez, M., Corbalán-García, S. y Gómez-Fernández, J.C. (2004). Calorimetric study of the interaction of the C2 domains of classical protein kinase C isoenzymes with Ca²⁺ and phospholipids. *Biochemistry* 43, 11727-39.
- Träuble, H. y Sackmann, E. (1972). Studies of the crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. 3. Structure of a steroid-lecithin system below and above the lipid-phase transition. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4499-4510.
- Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 8, 205-215.
- Tsutakawa, S.E., Medzihradszky, K.F., Flint, A.J., Burlingame, A.L. y Koshland Jr., D.E. (1995). Determination of in vivo phosphorylation sites in protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 270, 26807-26812.
- Tucker, W.C. y Chapman, E.R. (2002). Role of synaptotagmin in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Biochem. J.* 366, 1-13.
- Uberall, F., Giselbrecht, S., Hellbert, K., Fresser, F., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H.H. y Baierm G. (1997). Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 4072-4078.
- Ueda, Y., Hirai, S., Osada, S., Suzuki, A., Mizuno, K. y Ohno, S. (1996). Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner

- independent of Ras and dependent on Raf. *J. Biol. Chem.* 271, 23512-23519.
- Valverde, A.M., Sinnett-Smith, J., Van, L. y Rozengurt, E. (1994). Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8572-8576
- Van Blitterswijk, W.J. (1998). Hypothesis: ceramide conditionally activates atypical protein kinases C, Raf-1 and KSR through binding to their cysteine-rich domains. *Biochem. J.* 331, 679-680.
- Van Blitterswijk, W.J. y Houssa, B. (2000). Properties and functions of diacylglycerol kinases. *Cell signal* 12, 595-605.
- Van, B., Wim, J., Van, D.L., Arnold, H., Veldman, R.J., Verheij, M. y Borst, J. (2003). Arnold H., R. J. Veldman, M. Verheij, and J. Borst, Ceramide: Second Messenger or Modulator of Membrane Structure and Dynamics?. *Biochem. J.* 369, 199-211.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S.J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P.C., Woscholski, R., Parker, P.J. y Waterfield, M.D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 535-602.
- Verdaguer, N., Corbalán-García, S., Ochoa, W., Gómez-Fernández, J.C. y Fita, I. (2004) *In Handbook of metalloproteins* (Messerschmidt, A., Bode, W. y Cygler, M., eds.), John Wiley and Sons., New York.
- Verdaguer, N., Corbalán-García, S., Ochoa, W.F., Fita, I. y Gómez-Fernández, J.C. (1999). Ca²⁺ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Cα directly to phosphatidylserine. *EMBO J.* 18, 6329-6338.
- Vergères, G., Manenti, S., Weber, T. y Stürzinger, C. (1995). The myristoyl moiety of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) and MARCKS-related protein is embedded in the membrane *J. Biol. Chem.* 270, 19879-19887.
- Wakelam, M.J. (1998). Diacylglycerol--when is it an intracellular messenger? *Biochim. Biophys. Acta* 1436, 117-126.

- Walker, E.H., Perisic, O., Ried, C., Stephens, L. y Williams, R.L. (1999). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 402, 313-320.
- Waltham, M.C., Cornell, B.A., y Smith, R. (1986). Association of ferri- and ferro-cytochrome c with lipid multilayers: a ^{31}P solid-state NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* 862, 451-456.
- Wang, G., Silva, J., Krishnamurthy, K., Tran, E., Condie, B.G. y Bieberich, E. (2005). Direct binding to ceramide activates protein kinase C ζ before the formation of a pro-apoptotic complex with PAR-4 in differentiating stem cells. *J. Biol. Chem.* 280, 26415-26424.
- Wang, Q.J., Fang, T.W., Fenick, D., Garfield, S., Bienfait, B., Márquez, V.E. y Blumberg, P.M. (2000). The Lipophilicity of Phorbol Esters as a Critical Factor in Determining the Pattern of Translocation of Protein Kinase C Delta Fused to Green Fluorescent Protein. *J. Biol. Chem.* 275, 12136-12146.
- Wang, Y.J., Li, W.H., Wang, J., Xu, K., Dong, P., Luo, X. y Yin, H.L. (2004).) Critical role of PIP5K γ 87 in InsP $_3$ -mediated Ca $^{2+}$ signalling. *J. Cell Biol.* 167, 1005-1010.
- Wenk, M.R. y De Camilli, P. (2004). Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8262-8269.
- Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L.S., Pellicer, A., Cheng, V.C. y Axel, R. (1977). Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 11, 223-227.
- Williams, M.R., Arthur, J.S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P. y Alessi, D.R. (2000). The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Curr. Biol.* 10, 439-448.
- Williams, R.L. y Katan, M. (1996). Structural views of phosphoinositide-specific phospholipase C: signalling the way ahead. *Structure* 4, 1387-1394.

- Wiseman, T., Willinston, S., Brandts, J.F. y Lin, L.N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179, 131-137.
- Wong, P.T.T. y Mantsch, H.H. (1988). *Chem. Phys. Lipids* 46, 213-224.
- Wooten, M.W. (1999). Function for NF- κ B in neuronal survival: regulation by atypical protein kinase C. *J. Neurosci. Res.* 58, 607-611.
- Xu, Z.B., Chaudhary, D., Olland, S., Wolfrom, S., Czerwinski, R., Malakian, K., Lin, L., Stahl, M.L., Joseph-McCarthy, D. y Benander, C. (2004). Catalytic domain crystal structure of protein kinase C-theta (PKCtheta). *J. Biol. Chem.* 279, 50401-50409.
- Yaffe, M.B. (2002). Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 177-186.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Bamblin, S.J., Smerdon, S.J. y Cantley, L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 91, 961-971.
- Yagi, K., Shirai, Y., Hirai, M., Sakai, N. y Saito, N. (2004). Phospholipase A2 products retain a neuron specific gamma isoform of PKC on the plasma membrane through the C1 domain--a molecular mechanism for sustained enzyme activity. *Neurochem. Int.* 45, 39-47.
- Yakushiji, K., Sawai, H., Kawai, S., Kambara, M. y Domae, N. (2003). Characterization of C2-ceramide-resistant HL-60 subline (HL-CR): involvement of PKC delta in C2-ceramide resistance. *Exp. Cell Res.* 286, 396-402.
- Yang, J., Cron, P., Thompson, V., Good, V.M., Hess, D., Hemmings, B.A. y Barford, D. (2002). Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol. Cell.* 9, 1227-1240.
- Yang, L. y Glaser, M. (1995). Membrane domains containing phosphatidylserine and substrate can be important for the activation of protein kinase C. *Biochemistry* 34, 1500-1506.

- Yin, H.L. y Janmey, P.A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 761-789.
- Yonemoto, W., McGlone, M.L., Grant, B. y Taylor, S.S. (1997). Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Protein. Eng.* 10, 915-925.
- Zeidman, R., Lofgren, B., Pahlman, S. y Larsson, C. (1999). PKCepsilon, via its regulatory domain and independently of its catalytic domain, induces neurite-like processes in neuroblastoma cells. *J. Cell Biol.* 145, 713-726.
- Zhang, G., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M. y Hurley, J.H. (1995). Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester. *Cell* 81, 917-924.
- Zhang, X., Rizo, J. y Sudhof, T.C. (1998). Mechanism of phospholipid binding by the C2A-domain of synaptotagmin I. *Biochemistry* 37, 12395-12403.
- Zhang, Z.H., Johnson, J.A., Chen, L., El-Sherif, N., Mochly-Rosen, D. y Boutjdir, M. (1997). C2 region-derived peptides of beta-protein kinase C regulate cardiac Ca²⁺ channels. *Circ. Res.* 80, 720-729.
- Zhou, M., Horita, D.A., Waugh, D.S., Byrd, R.A. y Morrison, D.K. (2002). Solution structure and functional analysis of the cysteine-rich C1 domain of kinase suppressor of Ras (KSR). *J. Mol. Biol.* 315, 435-446.
- Zidovetzki, R. y Lester, D.S. (1992). The mechanism of activation of protein kinase C: a biophysical perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1134, 261-272.
- Ziegler, W.H., Parekh, D.B., Le Good, J.A., Whelan, R.D., Kelly, J.J., Frech, M., Hemmings, B.A. y Parker, P.J. (1999). Rapamycin-sensitive phosphorylation of PKC on a carboxy-terminal site by an atypical PKC complex. *Curr. Biol.* 9, 522-529.