



**Universitat de les  
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL  
2014**

**RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LA  
INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS G Y BICAPAS  
LIPÍDICAS**

**Rafael Alvarez Martínez**



**Universitat de les  
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL  
2014**

**Programa de Doctorado en Biología**

**RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LA  
INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS G Y BICAPAS  
LIPÍDICAS**

**Rafael Alvarez Martínez**

**Director/a: Dr. Pablo Vicente Escribá Ruíz**

**Doctor/a por la Universitat de les Illes Balears**



El presente trabajo: "RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LA INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS G Y BICAPAS LIPÍDICAS", presentado por Rafael Alvarez Martínez para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección en el departamento de Biología de la Universidad de las Islas Baleares.

Revisado el texto, estoy conforme con su presentación para ser juzgado.

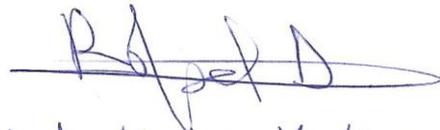
En Palma de Mallorca a 3 de Octubre de 2014

El director de la Tesis



Dr. Pablo V. Escribá Ruiz

El doctorando



Rafael Alvarez Martínez

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias al grupo de investigación que dirige el Dr. Pablo V. Escribá. El trabajo de investigación ha sido realizado en el laboratorio de Biomedicina Molecular y Celular, del departamento de Biología, en la Universidad de las Islas Baleares, gracias a una beca predoctoral del programa de formación de Doctores en el marco de las Unidades Asociadas entre Universidades y el CSIC, concedida por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Además, ha sido posible la culminación del trabajo gracias a una beca de la Fundación Universidad-Empresa y a una beca de la Fundación Marathón.



*“...¿Podemos acaso concebir que un ingeniero marciano que quisiera interpretar el funcionamiento de una calculadora terrestre, pudiera llegar a algún resultado si rehúsa, por principio, diseccionar los componentes electrónicos básicos que efectúan las operaciones de álgebra proposicional?...”*

**Jaques Monod, El azar y la necesidad (1970).**

## Agradecimientos

Deseo dedicar este librito a mi familia, y muy especialmente a mis abuelos Laudina y Antonio, a mis tíos Gelín y Geles, a mis padres Jovita y Rafael (“ el de Cutiellos”), a mi sobrino Rafa, a mi esposa Elizabet y a mis hijos Luz y Pablo. Y deseo agradecerles también todo el apoyo que siempre me han brindado en tan duro caminar. Allí donde voy os llevo conmigo.

Gracias abuela por haberme contagiado una pizca de ese espíritu del que tan admirablemente has hecho gala y que siempre ha impedido que te rindieras. Gracias mamá, por mostrarme lo que es la humildad. Y gracias papá, por avivar en mí la curiosidad por lo que me rodeaba, sobre todo, por aquello que en apariencia tenía menos importancia.

Gracias Eli, por tu paciencia y amor. No ha habido mayor estímulo para emprender con entusiasmo la complicada tarea del día a día de la ciencia. Y gracias por tu simpatía, que tantas veces me ha colmado de alegría.

Deseo también agradecer al Prof. Dr. Pablo V. Escribá Ruíz , con gran admiración y respeto, todo su apoyo, sus enseñanzas, el creer que podíamos llegar en algún momento a la meta, aun sabiendo que es mucho el trabajo que todavía queda pendiente. Pero sobre todo, me gustaría darle las gracias por haberme acercado a la auténtica Ciencia, la de verdad. Sin duda alguna, es enorme mi deuda con él.

Gracias al Prof. Dr. Xavier Busquets, miembro importante de este fabuloso equipo de trabajo del que he formado parte, por sus imprescindibles aportaciones a esta tesis.

Quiero aprovechar esta oportunidad que se me ha presentado para recordar a mis antiguos profesores: Teresa, Pepe, Chelo y Daniel Ruisánchez . A todos ellos, gracias, porque consiguieron con brillantez que cambiara totalmente mi concepción de las Ciencias. Gracias a ti también Santiago. Fuiste un gran maestro para mí. De todos vosotros guardaré siempre un recuerdo imborrable en mi memoria.

Gracias a mi hermana Noelia y a Fredo, por estar ahí. Vuestra presencia también ha sido imprescindible.

Gracias a Luisa “la de Oviedo”, que siempre me alentó a seguir y a superar cualquier obstáculo, por “alto que pudiera estar el listón”. Un abrazo fuerte, Luisa. Y otro para Arcadio.

Gracias a esos amigos de Asturias, Jairo y Luis, por muchos de los momentos más graciosos de mi vida.

Y por supuesto, gracias a los amigos y compañeros que me he encontrado en Mallorca, que también han sido imprescindibles para poder llegar con ánimo al final de esta obra. Gracias a mi amigo y cuñado David Racedo, que afortunadamente conocí, quizás debido a la mayor de las casualidades. Un abrazo para ti, y otro muy fuerte para tus padres, Catalina y Domingo.

Gracias a los primeros compañeros de andanza en esta larga travesía de la tesis: Jordi, Silvia, Jesús Casas, Jesús Prades, Paco y Vicky. Fue mucho y muy bueno lo que aprendí a vuestro lado. Espero Silvia que algún día podamos volver a parar en “Le Petit Poucet”.

Un recuerdo también para más compañeros de fatigas infatigables: Alicia, Amaia, Andrea, Antonio, Ariadna, Dani, Daniel López, Daniela, David, Francisca Guardiola, Gwendoline, Iván, Igor, Javi, Jeroni, Jerònia, Joan, Joana, Joel, Juan Carlos, Juana Barceló, Kaia, Laia, Laura, Laura Martín, Magda, Magdalena Cladera, Maitane, Manuel, Marcos, Marga, Margalida Mir, Margarita Ordinas, María Alonso, Maria Antonia Fiol, Maria Antonia Noguera, Martí, Miquel Barceló, Mónica, Ola, Paula, Raheem, Raquel, Roberto, Rogelio, Sergei, Tünde, Vicens, Víctor Asensio, Víctor Caraballo, Víctor Villar.

Deseo, por último, dar las gracias a otro formidable equipo humano y de trabajo. A Aina, a Andreu, a Angel, a Antonia, a las dos Cármenes, a Charo, a Encarna, a Guillem, a Llorenç, a María, a Masià, a Mati, a Pep Miquel, a Pep Sastre, a Sion, a Xisco y al personal de los Servicios Científico-Técnicos. A todos ellos, gracias por su extraordinaria y valiosa ayuda. Ahora que recuerdo. Xisco, creo que nos debes una ronda a Angel y a mí.

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	1
<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	8
<b>Capítulo 1: INTERACCIONES PROTEÍNA G<math>\alpha</math>i-LÍPIDO.</b>	
<b>1.1. Introducción</b> .....	11
<b>1.1.1. Los lípidos y la dinámica de las membranas lipídicas</b> .....	11
<b>1.1.2. Polimorfismo lipídico: las propiedades moduladoras de lípidos pro-no lamelares desde la perspectiva estructural</b> .....	12
<b>1.1.3. Dominios con estructura líquido-ordenada (L<sub>o</sub>) y dominios de tipo “raft”</b> .....	20
<b>1.1.4. La organización de los lípidos aniónicos en las bicapas lipídicas y su relevancia biológica</b> .....	24
<b>1.1.5. Las proteínas G y la transducción de señales</b> .....	25
<b>1.1.6. Bases moleculares de la interacción entre la proteína G y la membrana</b> .....	30
<b>1.2. Resultados</b> .....	35
<b>1.2.1. Caracterización lipídica de proteínas G<math>\alpha</math>i<sub>1</sub></b> .....	35
<b>1.2.2. Interacciones G<math>\alpha</math>i<sub>1</sub>-membranas</b> .....	39
<b>1.2.3. Análisis estructural del dominio N-terminal de G<math>\alpha</math>i<sub>1</sub></b> .....	47
<b>Capítulo 2: MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN DEL HETERODÍMERO G<math>\beta</math><math>\gamma</math> CON MEMBRANAS LIPÍDICAS.</b>	
<b>2.1. Introducción</b> .....	49
<b>2.1.1. Análisis estructural del complejo G<math>\beta</math><math>\gamma</math></b> .....	49
<b>2.1.2. Diversidad de las proteínas G<math>\beta</math> y G<math>\gamma</math>: la señalización celular en clave evolutiva</b> .....	53

2.1.3. Papeles del heterodímero $G\beta\gamma$ en la señalización celular.....	56
2.1.4. Implicación del dímero $G\beta\gamma$ en los procesos de crecimiento y diferenciación celulares.....	58
<b>2.2. Resultados.....</b>	<b>61</b>
2.2.1. Expresión, purificación y caracterización lipídica de complejos diméricos $G\beta_1\gamma_2$ .....	62
2.2.2. Interacciones de dímeros $G\beta_1\gamma_2$ con membranas modelo.....	66
2.2.3. Interacción de las proteínas $G\gamma_2$ , $G\beta_1$ y de los heterodímeros $G\beta_1\gamma_2$ con membranas biológicas.....	82

### **Capítulo 3: BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ CON MEMBRANAS LIPÍDICAS.**

<b>3.1. Introducción.....</b>	<b>86</b>
3.1.1. Estructura de las proteínas G heterotriméricas.....	86
3.1.1.1. Caracterización estructural de la interacción entre la proteína $G\alpha$ y el heterodímero $G\beta\gamma$ .....	86
3.1.1.2. Caracterización estructural de la interacción de la proteína G con los lípidos de la membrana.....	88
3.1.2. Tráfico subcelular de las proteínas G heterotriméricas.....	91
3.1.3. Estructura de los Receptores Acoplados a Proteínas G (RAPG).....	95
<b>3.2. Resultados.....</b>	<b>100</b>
3.2.1. Reconstitución, caracterización lipídica y purificación de complejos heterotriméricos $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ .....	100
3.2.2. Interacciones de complejos $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ con membranas modelo.....	104
3.2.3. Interacciones de proteínas $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ con membranas biológicas.....	120

### **Capítulo 4: DISCUSIÓN GENERAL.**

4.1. Interacciones entre la proteína $G\alpha_i$ y las membranas lipídicas.....	128
---	-----

<b>4.2. Caracterización de las interacciones del dímero <math>G\beta_1\gamma_2</math> con membranas lipídicas.....</b>	<b>133</b>
<b>4.3. Interacciones del heterotrímero <math>G\alpha_1\beta_1\gamma_2</math> con las bicapas lipídicas.....</b>	<b>139</b>
<b>4.4. Modelo general de interacciones entre proteínas G y membranas lipídicas.....</b>	<b>146</b>

<b>Capítulo 5: CONCLUSIONES .....</b>	<b>149</b>
---------------------------------------	------------

## **Capítulo 6: MATERIALES Y MÉTODOS.**

<b>6.1. MATERIALES.....</b>	<b>151</b>
<b>6.2. MÉTODOS.....</b>	<b>153</b>
<b>6.2.1. Experimentos de mutagénesis dirigida en la secuencia de la subunidad <math>\alpha_1</math> de la proteína G y clonación de las secuencias mutadas resultantes.....</b>	<b>153</b>
<b>6.2.2. Experimentos de mutagénesis dirigida en la secuencia de la subunidad <math>\gamma_2</math> de la proteína G y clonación de las secuencias mutadas.....</b>	<b>158</b>
<b>6.2.3. Expresión de proteínas G recombinantes en células Sf9.....</b>	<b>160</b>
<b>6.2.4. Ensayos de unión de las proteínas G a membranas biológicas.....</b>	<b>166</b>
<b>6.2.5. Purificación de las proteínas G.....</b>	<b>168</b>
<b>6.2.5.1. Purificación de las subunidades <math>G\alpha_1</math>.....</b>	<b>168</b>
<b>6.2.5.2. Purificación de los heterodímeros <math>G\beta_1\gamma_2</math>.....</b>	<b>171</b>
<b>6.2.6. Obtención de los complejos heterotriméricos <math>G\alpha\beta\gamma</math> mediante cromatografía de afinidad.....</b>	<b>172</b>
<b>6.2.7. Caracterización de las proteínas G recombinantes.....</b>	<b>174</b>
<b>6.2.7.1. Caracterización lipídica de las proteínas <math>G\alpha_1</math>.....</b>	<b>174</b>
<b>6.2.7.2. Caracterización lipídica de los heterodímeros <math>G\beta_1\gamma_2</math>.....</b>	<b>177</b>
<b>6.2.8. Preparación de las membranas modelo y análisis de la unión de las proteínas G.....</b>	<b>177</b>
<b>6.2.9. Métodos químicos de cuantificación.....</b>	<b>179</b>

<b>6.2.9.1. Cuantificación del fósforo inorgánico.....</b>	<b>179</b>
<b>6.2.9.2. Ensayo de determinación de colesterol.....</b>	<b>180</b>
<b>6.2.9.3. Aplicación del ensayo de Bradford a la detección de polioxietileno 10 lauril éter en solución.....</b>	<b>184</b>
<b>6.2.10. Análisis de las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína por “Western-blot”.....</b>	<b>187</b>
<b>6.2.10.1. “Western-blot” desnaturalizante.....</b>	<b>187</b>
<b>6.2.10.2. “Western-blot” no desnaturalizante.....</b>	<b>192</b>
<b>6.2.11. Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.....</b>	<b>193</b>
<b>6.2.12. Modelado informático.....</b>	<b>193</b>
<b>6.2.13. Análisis estadístico de los datos.....</b>	<b>194</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>195</b>

## ABREVIATURAS

- $\alpha_{2A/D}$ -AR:** adrenoceptor  $\alpha_{2A/D}$
- AC:** adenilil ciclase
- AG:** ácido graso
- AMPC:** adenosín monofosfato -3',5' cíclico
- ATP:** adenosina 5'-trifosfato
- Bluo-Gal:** "5-bromo-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside"
- C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>:** Polioxietileno 10 lauril éter
- CCT:** complejo "chaperonin containing tailless-complex polypeptide 1"
- CHAPS:** "3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate"
- Cho:** colesterol
- DAG:** diacilglicerol
- DNM:** daunorubicina
- DEPE:** 1,2-dielaidoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina
- DOPC:** 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina
- DOPE:** 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina
- DPPC:** dipalmitoil fosfatidilcolina
- DTT:** ditioneitol
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- ERK:** quinasa regulada por señal extracelular
- EA:** ácido trans-9-octadecenoico o ácido elaídico
- FN:** trans,trans,trans-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol o farnesol
- FPA:** ácido 2-fluoropalmítico
- GG:** trans,trans,trans,trans-3,7,11,15-tetrametil-2,6,10,14-hexadecatetraen-1-ol o geranilgeraniol
- GDP:** guanosina 5'-difosfato
- GDP $\beta$ S:** guanosina 5'-[ $\beta$ -tio]difosfato
- G $\alpha_{\text{gus}}$ :** proteína G $\alpha$  implicada en la respuesta a estímulos de tipo gustativo
- G $\alpha_i$ :** subunidad  $\alpha$  del complejo de proteínas G heterotriméricas G<sub>i</sub>
- G $\alpha_o$ :** subunidad  $\alpha$  del complejo de proteínas G heterotriméricas G<sub>o</sub>
- G $\alpha_t$ :** subunidad  $\alpha$  del complejo de proteínas G heterotriméricas G<sub>t</sub>
- G<sub>i</sub>:** proteína G heterotrimérica inhibidora del enzima adenilil ciclase

**G<sub>o</sub>**: proteína G heterotrimérica inhibidora del enzima adenilil ciclasa y moduladora de canales de Ca<sup>2+</sup>

**GPA1**: proteína G de levaduras homóloga de la subunidad α de las proteínas G de mamíferos.

**G<sub>t</sub>**: transducina (proteína G heterotrimérica transductora de la señal visual)

**GTP**: guanosina 5'-trifosfato

**GTPγS**: guanosina 5'-[γ-tio]trifosfato

**GPI**: glucosilfosfatidilinositol

**GRK**: proteína quinasa de receptores acoplados a proteínas G

**HEPES**: N-(2-hidroxi-etil) piperazina-N'--(ácido 2-etanosulfónico), sal de sodio

**HMA**: ácido 2-hidroximirístico

**H<sub>I</sub>**: estructura lipídica de tipo hexagonal no invertida

**H<sub>II</sub>**: estructura lipídica de tipo hexagonal invertida

**Icmt**: isoprenilcisteín-carboxil-metiltransferasa

**IPTG**: Isopropil β-D-1-Tiogalactopiranosido

**JNK**: proteína quinasa Jun N-terminal

**L<sub>α</sub>**: estructura lipídica de tipo lamelar en fase cristal-líquida

**L<sub>β</sub>**: estructura lamelar en fase gel

**L<sub>c</sub>**: estructura lamelar en fase cristalina

**L<sub>d</sub>**: estructura lamelar de tipo líquido-desordenada

**L<sub>o</sub>**: estructura lamelar de tipo líquido-ordenada

**LPA**: ácido lisofosfatídico

**LUV**: vesícula unilamelar grande

**MAPK**: proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés, "Mitogen Activated Protein Kinase")

**MLV**: vesículas multilamelares

**Ni-NTA**: complejo de ácido nitrilotriacético y níquel

**μ<sub>E</sub>**: energía libre elástica

**OA**, ácido cis-9-octadecenoico o ácido oleico

**PA**: ácido fosfatídico

**PAT**: enzima palmitoil-acil-transferasa

**PC**: fosfatidilcolina

**PCR**: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, "Polimerase Chain Reaction")

**PE:** fosfatidiletanolamina

**PG:** fosfatidilglicerol

**PhLP1:** “Phosducin-like protein”

**PI3K:** enzima fosfatidilinositol-3'-quinasa

**PI:** fosfatidilinositol

**PIP:** fosfatidilinositol 4-fosfato

**PIP<sub>2</sub>:** fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

**PIP<sub>3</sub>:** fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

**PKB:** enzima proteína quinasa de tipo B, también denominada *Akt*

**PKC:** proteína quinasa de tipo C

**PL:** fosfolípido

**PLC:** enzima fosfolipasa C

**PMSF:** “phenylmethylsulfonyl fluoride”

**POPE:** 1-palmitoil-2-oleoil fosfatidiletanolamina

**Proteína G:** proteína de unión a nucleótidos de guanina

**PS:** fosfatidilserina

**PtdIns(4)P:** fosfatidilinositol-4'-fosfato

**R<sub>0</sub>:** radio de curvatura intrínseca

**RAPG:** receptor acoplado a proteínas G

**RCE:** enzima proteolítica “Ras Converting Enzyme”

**RE:** retículo endoplasmático

**RMN <sup>31</sup>P:** resonancia magnética nuclear de fósforo 31

**AS:** ácido octadecanoico o ácido esteárico

**SBF:** suero bovino fetal

**SDS:** sodio dodecil sulfato

**SM:** esfingomielina

**SNC:** sistema nervioso central

**Src:** familia de proteínas de señalización con actividad tirosina quinasa, pero sin actividad receptora

**SUV:** vesícula unilamellar pequeña

**T<sub>h</sub>:** T<sup>a</sup> de transición de estructura lamelar (L<sub>α</sub>) a estructura hexagonal invertida (H<sub>II</sub>)

**T<sub>m</sub>:** T<sup>a</sup> de transición de fase gel (L<sub>β</sub>) a fase cristal-líquida (L<sub>α</sub>) o temperatura de fusión

## RESUMEN

Las proteínas G heterotriméricas constituyen complejos de señalización claves para la propagación de señales del exterior al interior de las células. Un mensajero primario cuya naturaleza puede ser muy diversa (proteína, péptido, pequeño neurotransmisor, iones, fotones...) estimula un receptor de membrana heptahelicoidal acoplado a proteína G. Su activación produce un cambio conformacional en la proteína G que se halla acoplada al receptor, que a su vez se activa. Entonces, la subunidad  $G\alpha$  intercambia GDP por GTP y se disocia del dímero  $G\beta\gamma$ . El receptor, que permanece activado, puede recibir otras proteínas G de forma secuencial y activarlas. Para ello, las proteínas G están en exceso molar respecto a los receptores que las activan, lo cual conduce a una considerable amplificación de la señal.

Las proteínas G heterotriméricas están constituidas por tres subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Hasta la fecha hay descritas en la especie humana 16 variantes de la subunidad  $\alpha$ , 6 de la subunidad  $\beta$  y 12 de la  $\gamma$  (Escribá et al, 2007; Dupré et al, 2009). Tras la activación del complejo heterotrimérico, la subunidad  $\alpha$  por un lado, y el dímero  $G\beta\gamma$  por otro, se dirigen hacia sus respectivas proteínas efectoras, modulando positiva o negativamente su actividad. Las subunidades  $\alpha$  pueden incorporar en su extremo amino-terminal los ácidos grasos mirístico y/o palmítico, mientras que las subunidades  $\gamma$  pueden verse modificadas en su extremo carboxi-terminal por los lípidos isoprenoides farnesilo o geranilgeranilo.

Un evento crítico para la propagación del mensaje por parte de las proteínas G es su anclaje a la membrana plasmática. Este fenómeno tiene lugar a través de los puntos de las proteínas G donde ocurre la unión covalente de lípidos a las proteínas. Se sabe que el complejo  $G\alpha_{i1}\beta_{1}\gamma_2$  es capaz de incorporar los ácidos grasos mirístico y palmítico, que irían unidos a la proteína  $G\alpha_{i1}$ , y el lípido geranilgeranilo, unido a la subunidad  $G\gamma_2$ . Dado que cada tipo de proteína G puede acoplarse con varios tipos de receptores (y viceversa) la localización subcelular de dichas proteínas en determinados microdominios de membrana influye en la señalización celular. Éste fue el complejo multiproteico elegido como modelo de estudio en esta Tesis Doctoral, con el objetivo de determinar el papel que los lípidos de las proteínas G, y determinados dominios adyacentes, juegan en las decisivas interacciones proteína-lípido. También se trató de

comprender el efecto que diferentes lípidos, representativos de distintos dominios lipídicos de las membranas biológicas, tienen en dichas interacciones.

Los resultados expuestos en este trabajo pusieron de manifiesto la importancia crucial que los lípidos de las proteínas G tienen en la señalización celular, promoviendo por un lado el anclaje de las proteínas G a las membranas biológicas; y, por otro lado, dirigiendo el movimiento de las proteínas G en el plano lateral de dichas membranas, entre microdominios de diferente estructura y composición lipídica.

Para llevar a cabo este estudio, se generaron diferentes proteínas  $G\alpha_1$  y  $G\gamma_2$ , mutadas en los puntos en los que se produce la incorporación de los lípidos. También se analizó un pequeño dominio polibásico situado muy próximo al lípido geranilgeraniol de la proteína  $G\gamma_2$ , constituido por tres aminoácidos básicos. Así, también se practicó mutagénesis dirigida contra esos aminoácidos básicos, al efecto de poder determinar su implicación en la interacción de las proteínas G con diferentes microdominios lipídicos.

Se comprobó que el ácido mirístico fue decisivo para el anclaje de la proteína  $G\alpha_1$  a membranas lipídicas modelo. Su ausencia provocó la separación casi total de la proteína  $G\alpha_1$  de los distintos tipos de membranas modelo estudiados. Por otro lado, la miristoilación de  $G\alpha_1$  puso de manifiesto la preferencia por microdominios lipídicos ordenados ( $L_o$ ) ricos en PS de una subunidad  $G\alpha_1$  miristoilada pero no palmitoilada. En cambio, la proteína  $G\alpha_1$  miristoilada y palmitoilada simultáneamente mostró una clara preferencia por microdominios de tipo “raft” pobres en PS.

El ácido palmítico es un lípido que se une reversiblemente a la proteína  $G\alpha_1$ , con lo que podría dar lugar a importantes cambios conformacionales en la región N-terminal de la proteína que llevarían al distanciamiento o acercamiento de aminoácidos básicos de esa región a la superficie de la membrana plasmática, dependiendo de si dicho ácido graso se halla o no unido a la proteína.

En el caso del dímero  $G\beta_1\gamma_2$ , se observó que también el lípido isoprenoide geranilgeraniol fue esencial, promoviendo la unión de todo el heterodímero a las membranas lipídicas. Su presencia determinó la preferencia del complejo  $G\beta_1\gamma_2$  por microdominios lipídicos con alta propensión a adoptar una estructura de tipo no lamelar, y muy especialmente por microdominios ricos en PE y PS. La ausencia del aminoácido cargado positivamente, *Lys-64*, y sobre todo de los aminoácidos *Arg-62* y *Lys-65* en la región C-terminal de  $G\gamma_2$ , supuso la pérdida parcial e incluso total de esa mayor unión a los microdominios lipídicos anteriormente citados. Así pues, los aminoácidos básicos próximos al resto geranilgeraniol constituyen determinantes moleculares claves de la

interacción con microdominios ricos en lípidos pro-no lamelares. Además, estos aminoácidos se revelaron como los principales responsables de las interacciones de tipo electrostático que se establecen entre el dímero  $G\beta_1\gamma_2$  y las bicapas lipídicas.

Como ocurriera con  $G\alpha_i$  y con  $G\beta_1\gamma_2$ , también en el caso del complejo  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ , el ácido mirístico y el lípido isoprenoide jugaron un papel determinante, conduciendo todos los complejos portadores de estas dos modificaciones hacia microdominios ricos en PE, con alta propensión a adoptar una estructura de tipo no lamelar.

El ácido palmítico constituyó, también en el heterotrímero  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ , un potente regulador de las interacciones proteína-lípido, provocando importantes cambios conformacionales en el complejo multiproteico. Su presencia provocó el desenmascaramiento de aminoácidos aniónicos que, al localizarse próximos a la superficie de la membrana, condicionaron el movimiento de todo el complejo lejos de microdominios de membrana ricos en PS. A diferencia de la proteína  $G\alpha_i$  miristoilada y palmitoilada, el destino preferido del complejo  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  miristoilado, palmitoilado e isoprenilado, fueron microdominios lipídicos de estructura pro-no lamelar (es decir, con un empaquetamiento superficial laxo).

La ausencia de ácido palmítico unido al complejo multiproteico, determinó una unión preferencial de dicho complejo a microdominios lipídicos ricos en PE y PS, el mismo tipo de dominios a los que se unió mayoritariamente el dímero  $G\beta_1\gamma_2$ . Se ha visto que también en el caso del heterotrímero sin ácido palmítico unido, los aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$ , *Lys-64*, *Arg-62* y *Lys-65*, son determinantes en las interacciones de tipo electrostático que tienen lugar con microdominios lipídicos ricos en PS.

Los resultados presentados en este trabajo permiten tener una visión más completa acerca de los mecanismos moleculares implicados en las interacciones de las proteínas G con los lípidos de membrana y, por tanto, en el proceso de transducción de señales. Además, este conocimiento permite diseñar estrategias para regular la señalización basadas en el control de los lípidos de membrana que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos.

# Capítulo 1

## INTERACCIONES PROTEÍNA G $\alpha$ i -LÍPIDO.

### 1.1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1.1. Los lípidos y la dinámica de las membranas lipídicas.

La visión clásica de las membranas biológicas como un medio estructuralmente homogéneo, en el que proteínas y lípidos se mueven de una manera libre y aleatoria (Singer & Nicolson, 1972), ha dado paso a un concepto más completo sustentado en las innovadoras medidas de dinámica de membranas. Esta ampliación del modelo de Singer y Nicolson otorga una nueva dimensión al concepto de mosaicismo: los lípidos y las proteínas de las membranas se organizan siguiendo patrones de codistribución no aleatoria, constituyendo pequeños agrupamientos a una escala de unos pocos nanómetros (1-10 nm.), y agrupamientos a una mayor escala, de centenares de nanómetros e incluso micrómetros ( Vereb et al, 2003; Lingwood & Simons, 2010).

Una propiedad muy importante de este tipo de microdominios de membrana es su dinamismo: se trataría de estructuras supramoleculares que continuamente se estarían creando y destruyendo. Estaríamos ante lo que se ha denominado *mosaicismo dinámicamente estructurado* (Vereb et al, 2003). Ciertas restricciones al libre movimiento de lípidos y proteínas por las membranas vendrían impuestas por interacciones específicas lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína (Vereb et al, 2003).

Lípidos y proteínas se elevan al mismo nivel de relevancia en este marco conceptual más amplio. La forma molecular de los lípidos de membrana determina su segregación en dominios e influyen decisivamente en las propiedades físico-químicas de las membranas (Giorgione et al, 1995; Escribá et al, 1997; Farkas et al, 2000; Garab et al, 2000). Dichas propiedades influyen en gran manera en el tipo de proteínas periféricas que interaccionan con la membrana y, por lo tanto, influyen en la señalización celular

(Escribá et al, 1995). Por su parte, las proteínas son elementos estructurales tan importantes como los lípidos: las proteínas que interactúan con la membrana pueden también modelar la estructura lipídica secundaria (Escribá, 2006). Así, por ejemplo, uno podría concebir una proteína como un elemento central de una unidad básica de “raft”, en torno al cual se dispondrían lípidos en base a criterios de polaridad y complementariedad estérica (Vereb et al., 2003). Incluso, un análisis de las estructuras primaria y secundaria de las proteínas permitiría predecir el entorno lipídico en el que podrían estar embebidas total o parcialmente. Dominios proteicos con una estructura de tipo hélice  $\alpha$  que atraviesan membranas, o proteínas de membrana con una modificación lipídica determinada, muestran afinidad por un determinado tipo de estructura de membrana, modulándola a su vez cuando ocurre la interacción (Escribá et al, 1997; Funari et al, 2005; Vereb et al, 2003).

En este contexto, proteínas con grupos acilo saturados unidos covalentemente parecen mostrar mayor preferencia por dominios con una estructura ordenada de tipo “lipid raft”, mientras que proteínas preniladas tenderían a ser excluidas de este tipo de formaciones (Melkonian et al, 1999; Resh, 1999; Moffett et al, 2000). Muchas de estas proteínas desempeñan un papel clave en la señalización celular.

Estas conclusiones, junto con el carácter dinámico en cuanto a composición, localización y tamaño que se le atribuye a los “lipid rafts” (Vereb et al, 2003; Lingwood et al, 2009; Lingwood & Simons, 2010), reflejan la trascendencia de los modelos actuales explicativos de la organización y la dinámica de las membranas biológicas.

### **1.1.2. Polimorfismo lipídico: las propiedades moduladoras de lípidos pro-no lamelares desde la perspectiva estructural.**

Las importantes aportaciones de Singer y Nicolson acerca de la naturaleza estructural de las membranas biológicas han contribuido decisivamente a la creación y desarrollo de un marco de trabajo de carácter revisionista, con el que reformular toda idea de homogeneidad en las membranas biológicas.

Importantes hallazgos biofísicos y bioquímicos se han venido acumulando en las últimas décadas, fundamentados en estudios en sistemas de membranas modelo y en el análisis del comportamiento de proteínas de membrana aisladas o fragmentos de éstas en dichos sistemas. Los resultados de estos trabajos corroboran las hipótesis de la

asimetría lateral y transversal de las membranas biológicas (Rothman & Lenard, 1977; Escribá et al, 1997; Vögler et al, 2004; Funari et al, 2005; Veatch & Keller, 2005; Barceló et al, 2007). En este contexto de heterogeneidad en la organización de las membranas, una componente estructural denominada *polimorfismo lipídico* constituye un factor clave (Escribá et al, 1997).

El polimorfismo lipídico o mesomorfismo lipídico podría definirse como una propiedad de los lípidos para adoptar diferentes organizaciones supramoleculares. Esta propiedad depende de dos tipos de características (Israelachvili et al., 1980; Escribá, 2006):

- i) características intrínsecas de la molécula lipídica considerada, lo que en su conjunto definiría una determinada forma lipídica.
- ii) características independientes del tipo de lípido, como son el pH, la temperatura, la fuerza iónica, el grado de hidratación.

El concepto de forma lipídica es conveniente, a la vez que relevante y amplio. Se usa para describir el volumen ocupado por los fosfolípidos en el espacio y está en función de la estructura intrínseca de la molécula, y de sus propiedades electroquímicas (Israelachvili et al., 1980).

No obstante, a raíz de lo expuesto anteriormente, conviene también considerar la relatividad del concepto, pues la forma de un lípido puede estar muy condicionada en un momento dado por la presión lateral que exista en los distintos puntos de la molécula lipídica, por su grado de hidratación, por la temperatura e incluso el tipo de residuos de ácidos grasos que porte. En relación con estos restos acilo, su longitud, su orientación respecto al plano horizontal de la bicapa, el grado de instauración de los mismos, la posición de las instauraciones dentro de las cadenas, son propiedades relevantes en el comportamiento de fase de la molécula (Kirk et al, 1984; Epanand et al, 1996; Lohner, 1996).

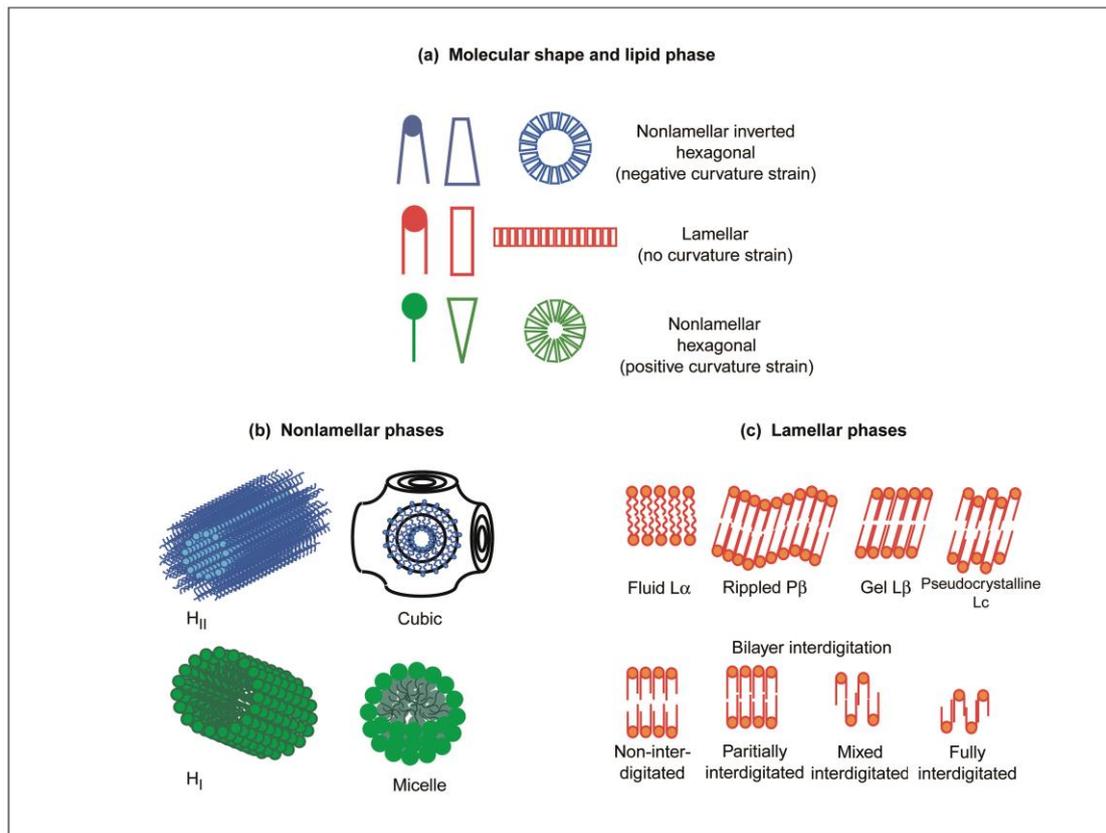
Un enfoque basado en el análisis de la forma lipídica podría ayudar a explicar de una manera clara y sencilla la organización supramolecular que son capaces de adoptar los diferentes lípidos en la naturaleza (figura 1-1-1): bien dando lugar a estructuras de tipo bicapa, también llamadas lamelares, o bien, constituyendo estructuras de tipo no lamelar (micelas tubulares, fases hexagonales, fases cúbicas). Así, los lípidos pueden ser clasificados según el volumen relativo de su cabeza polar respecto al volumen de sus cadenas de ácidos grasos, del siguiente modo (Israelachvili et al., 1980; Escribá et al, 1997; Escribá, 2006):

i) lípidos similares a cilindros (ej. fosfatidilcolina), con una cabeza polar voluminosa, que darían lugar a una organización supramolecular de tipo lamelar.

ii) lípidos con una cabeza polar más pequeña en relación al resto de la molécula, similares a conos truncados (ej. fosfatidiletanolamina, diacilglicerol), que darían lugar a estructuras de tipo no lamelar *in vitro*, entre ellas la denominada fase hexagonal invertida ( $H_{II}$ ).

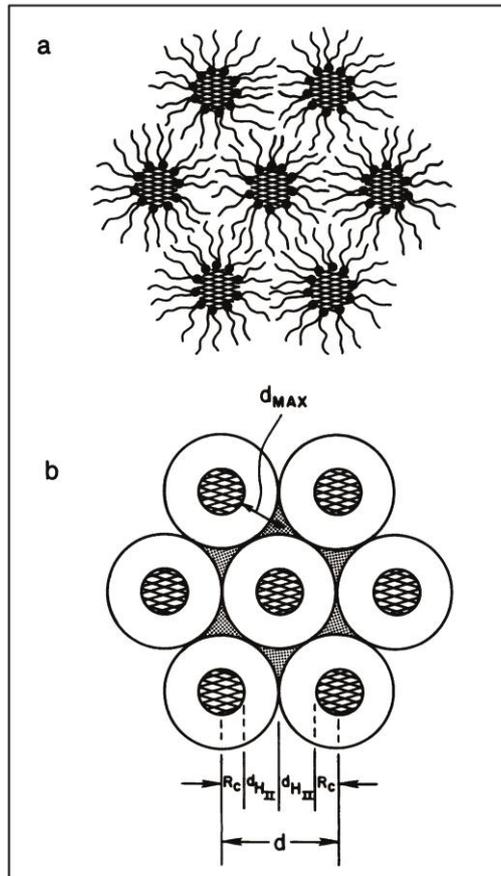
iii) lípidos similares a conos invertidos (ej. lisofosfatidilcolina), con una sola cadena acilo, que *in vitro* darían lugar a estructuras no lamelares diferentes a las anteriores, de tipo fase hexagonal no invertida ( $H_I$ ).

Un mismo lípido con tendencia a constituir ordenamientos de tipo no lamelar, puede presentarse organizado de esta forma o bien constituyendo diferentes estructuras de tipo lamelar, dependiendo de factores ya mencionados como la temperatura. Kirk et al. formularon una teoría de la transición de fase  $L_\alpha$ - $H_{II}$  (Kirk et al, 1984), en la que se expresa en términos energéticos la tendencia de una monocapa lipídica a relajarse por completo, constituyendo una red estructural de tipo no lamelar. La energía libre elástica ( $\mu_E$ ) en esta situación de máxima estabilidad sería mínima. La consecución de ese estado depende de una propiedad del lípido íntimamente ligada al concepto de forma lipídica: el radio de curvatura intrínseca,  $R_0$ .  $R_0$  se define como el radio de curvatura de la interfase lípido-agua que minimiza  $\mu_E$ . Factores que tienden a aumentar el volumen relativo de la región de las colas hidrocarbonadas, tales como la temperatura o la insaturación de las cadenas, disminuyen  $R_0$ . Por el contrario, factores que tienden a aumentar el área efectiva de la cabeza polar (ej. carga del grupo de la cabeza polar) incrementan  $R_0$ . En consecuencia, lípidos con una mayor predisposición a originar estructuras de tipo no lamelar tendrán un valor más reducido de  $R_0$  y viceversa (Kirk et al, 1984; Gruner, 1985). Esta importante característica de los lípidos tendrá grandes implicaciones funcionales.



**Figura 1-1-1. Estructura de los lípidos de membrana.** Diferentes tipos de formas lipídicas y su influencia en la estructura de una membrana. (a) Lípidos con una pequeña cabeza polar (en azul), como la fosfatidiletanolamina, tienen una forma molecular similar a un cono truncado. En cambio, lípidos con una cabeza polar voluminosa y una única cola hidrocarbonada (en verde), como los lisofosfolípidos, tienen una forma similar a un cono invertido. Los primeros inducen una tensión de curvatura negativa en las membranas de las que forman parte, mientras que los segundos inducen una tensión de curvatura positiva, y en ambos casos su agregación da lugar a macroestructuras de tipo no lamelar (b). Son considerados por ello lípidos pro-no lamelares. Por su parte, lípidos como la fosfatidilcolina, con volúmenes similares en sus regiones polar e hidrofóbica, se asemejan a cilindros (a), y su agregación da lugar a estructuras de tipo lamelar (c) (figura adaptada de Escribá, P.V. (2006) *Trends Mol Med*, **12**: 34-43).

Cuando se forman estructuras de tipo no lamelar, se originan a su vez huecos vacíos en los espacios intersticiales que quedan entre las micelas. Tales huecos han de ser rellenados por las colas hidrocarbonadas, a fin de evitar la formación de volúmenes vacíos en el cuerpo hidrofóbico, energéticamente muy desfavorables (figura 1-1-2). Esta energía libre de empaquetamiento de las colas hidrocarbonadas se opone a la formación de estructuras de tipo no bicapa. Otros factores que también tienden a contrarrestar la aparición de este tipo de estructuras curvadas son la repulsión por hidratación y la repulsión electrostática, los cuales favorecen la expansión de las superficies lipídicas susceptibles de curvarse ( Kirk et al, 1984; Gruner, 1985).

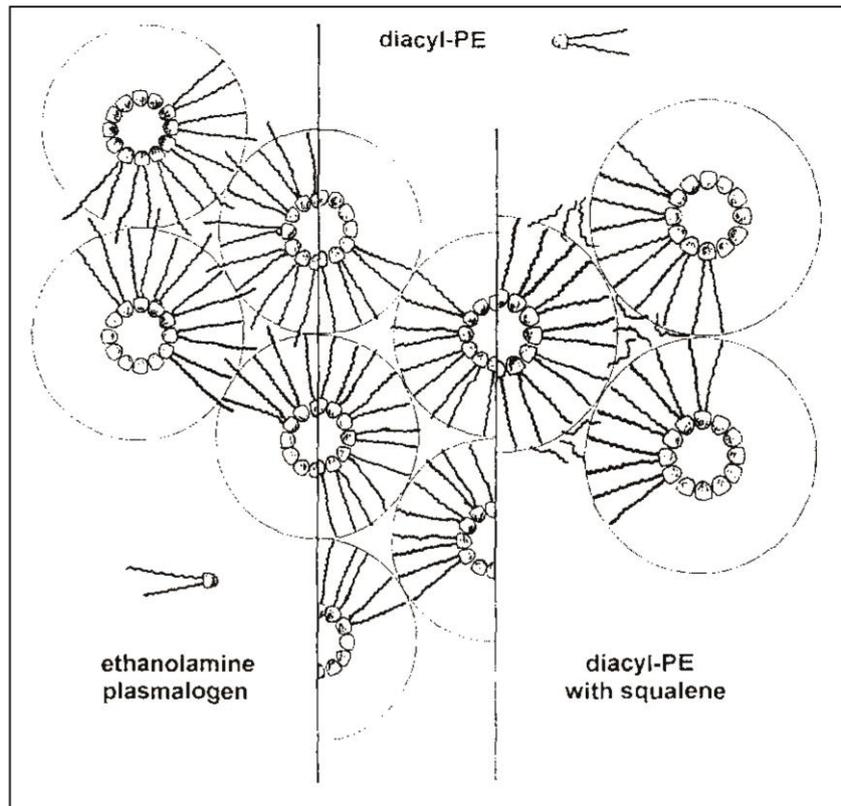


**Figura 1-1-2. Secciones transversales de siete celdas de una red hexagonal de tipo  $H_{II}$ .** (a) Las cabezas polares de los lípidos no lamelares son representadas por puntos negros unidos a las líneas onduladas que simbolizan las colas hidrocarbonadas. Las áreas sombreadas, que quedan delimitadas por esos lípidos, representan el agua que circula por el interior de los cilindros de la red. (b) Representación esquemática sencilla de la fase  $H_{II}$ . Las áreas punteadas, entre los distintos anillos de la red hexagonal, representan regiones de inestabilidad energética, debida al empaquetamiento de las colas hidrocarbonadas (figura adaptada de Gruner, S.M. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**: 3665-3669).

Sin abandonar este contexto termodinámico, la introducción en el sistema de cualquier variable que contribuya a reducir la energía libre de empaquetamiento de las colas hidrocarbonadas, favorecería la transición hacia estados conformacionales de tipo no lamelar (Gruner, 1985; Lohner, 1996). Una forma de conseguirlo sería mediante la participación de lípidos con propiedades de empaquetamiento de sus colas hidrocarbonadas más aptas para superar el estrés de empaquetamiento, como en el caso de los plasmalógenos (figura 1-1-3). Estas moléculas tienen una mayor longitud efectiva de la cadena acil en la posición sn-2, en comparación con los diacil fosfolípidos análogos (Lohner, 1996). Otra forma sería mediante la adición de moléculas hidrofóbicas capaces de rellenar los intersticios de los cilindros lipídicos de tipo  $H_{II}$ , aminorando también en este caso los costes en energía libre (figura 1-1-3). En concreto,

moléculas hidrofóbicas voluminosas y de morfología irregular, del tipo de los isoprenoides, son particularmente efectivas (Lohner, 1996; Funari et al, 2005; Barceló et al, 2007).

¿Cuál es el papel fisiológico *in vivo* de los lípidos proclives a formar estructuras no lamelares *in vitro*? En una célula pueden aparecer estructuras no lamelares de forma transitoria. Un ejemplo sería la fusión de membranas que tiene lugar en neuronas que liberan neurotransmisor a partir de la fusión de vesículas que aparecen en el terminal presináptico (Qian & Huang, 2012). Otro ejemplo serían los procesos de fisión de membranas, como el que ocurre durante la división celular o citocinesis. Se ha observado que para que se formen estas estructuras no lamelares se requiere la acumulación de lípidos como la fosfatidiletanolamina (Emoto et al, 1996). Sin embargo, la mayor parte de moléculas de fosfatidiletanolamina están formando estructuras lamelares durante la mayor parte de su existencia. En las células de mamífero, es usual que la monocapa interna tenga una proporción elevada de este fosfolípido, que se asocia a dominios lamelares no ordenados ( $L_d$ ) y es excluido de dominios lamelares ordenados ( $L_o$ ), como los “lipid rafts”. En estos dominios, la baja presión lateral de superficie que ejerce la pequeña cabeza polar de la fosfatidiletanolamina permite la inserción y anclaje de ciertas proteínas. Un ejemplo lo constituiría el voluminoso resto isoprenoide de la proteína  $G\gamma_2$ , que se podría anclar en estas regiones  $L_d$  pero que tiene problemas para anclarse en microdominios de membrana muy ordenados y con un empaquetamiento de superficie denso (es decir, una presión lateral de superficie elevada). Esta afinidad que presentan ciertas proteínas por uno u otro tipo de dominio, que ha sido uno de los temas centrales de la presente Tesis Doctoral, explicaría cómo proteínas de señal incrementan las posibilidades de propagación de mensajes encontrándose en microdominios de membrana con lípidos definidos, donde mantendrían contacto físico.



**Figura 1-1-3. Esquema representativo de tres modelos diferentes de empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas en la fase hexagonal inversa.** En la parte izquierda de la imagen, la conformación extendida que adopta la cadena hidrocarbonada más alargada del plasmalógeno de etanolamina, favorece el empaquetamiento lipídico necesario para la consecución de estructuras de tipo  $H_{II}$ . En la parte central, el empaquetamiento de fosfolípidos del tipo de la fosfatidiletanolamina es más complicado, quedando huecos sin rellenar que constituyen una desventaja energética. En la parte derecha de la imagen, una molécula hidrofóbica como el escualeno es capaz de rellenar los espacios intersticiales que se ven vacíos en el centro de la imagen (figura adaptada de Lohner, K. (1996) *Chem Phys Lipids*, **81**: 167-184).

### Curvatura intrínseca de las membranas biológicas

En estrecha relación con la teoría de la transición de fase  $L_{\alpha}$ - $H_{II}$  anteriormente expuesta, algunos trabajos (Gruner, 1985) abordan el tema bajo el prisma del *radio de curvatura intrínseca*,  $R_0$ , *óptimo para las membranas biológicas*, que les permitiría tener una estructura estable de bicapa la mayor parte del tiempo. Simultáneamente, posibilitaría que pudieran ocurrir alteraciones puntuales de esa estructura durante eventos localizados, como la fusión de membranas, la endocitosis, la fisión celular, etc. Se trataría, en síntesis, de un valor de  $R_0$  que no fuera ni demasiado grande, ni demasiado pequeño (Gruner, 1985).

Así, surge una hipótesis de la curvatura que consta de dos partes (Gruner, 1985):

- i) Las células vivas ejercen un control homeostático sobre sus membranas, controlando las curvaturas intrínsecas de las mismas.
- ii) Existen inestabilidades locales de la superficie lipídica, dependientes de la geometría y con implicaciones funcionales importantes, moduladas por la variación local de los siguientes componentes de la energía libre: el empaquetamiento hidrofóbico, la hidratación y/o la componente electrostática.

Un nuevo concepto bien podría encontrar su definición en este segundo punto: el concepto de *dominio de membrana*. En las décadas de los setenta y ochenta, el papel de los lípidos de membrana distaba mucho de conocerse de forma exhaustiva. En esta época se empieza a considerar la posible existencia de una heterogeneidad estructural y composicional en el plano lateral de las membranas biológicas. Cada vez son más numerosos los trabajos que contemplan la existencia de *dominios*, debido a la distribución heterogénea de los lípidos en la superficie de membranas lipídicas naturales y artificiales, al observar que los lípidos que las constituyen dan lugar a mezclas no homogéneas de los mismos (Mabrey et al, 1978).

A partir de la hipótesis de la curvatura intrínseca, se hacen otras consideraciones relevantes para tratar de explicar los mecanismos implicados en la desestabilización local de la estructura lamelar de la bicapa (o lo que es lo mismo, la estabilización de estructuras no lamelares implicadas de forma transitoria en algunos procesos relevantes de la fisiología celular). Y así, se introduce la idea según la cual las proteínas, como los lípidos, desempeñan un papel muy importante en esa desestabilización. Se especula con la posibilidad de que exista una nueva clase de proteínas de membrana: proteínas que tienen una parte específica de sitio, que les permite alcanzar la región donde ocurrirá la desestabilización, y una cola hidrofóbica que arrastran consigo y que es clave en tal desestabilización (Gruner, 1985). Es posible encontrar un ejemplo de esto último en alguna de las proteínas que forman parte del complejo multiproteico (sinaptotagmina, complexina, tSNARE, vSNARE) implicado en la fusión de vesículas de neurotransmisor con la membrana plasmática presináptica (sinaptotagmina, tSNARE, vSNARE). Más concretamente, la sinaptotagmina consta de dos dominios denominados C2A y C2B, capaces ambos de formar un complejo con iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y que estarían implicados en el reconocimiento de regiones específicas de la membrana plasmática y

de la vesícula de transporte. Esta proteína actúa regulando positivamente el proceso de fusión de membranas (Südhof y Rothman, 2009). De acuerdo con las hipótesis que se barajan actualmente, el dominio C2B parece estar implicado decisivamente en el reconocimiento de determinados dominios ricos en PIP<sub>2</sub> en la membrana presináptica (Honigmann et al, 2013). Este dominio arrastraría consigo regiones de la proteína que contribuirían a desestabilizar la membrana en esos puntos de contacto, aumentando con ello la tensión de curvatura y favoreciendo así termodinámicamente la fusión de membranas (McMahon et al, 2010).

A partir de estos planteamientos, nos acercamos a la trascendencia funcional del polimorfismo lipídico. Este fenómeno no sólo estaría implicado en eventos tan importantes como la fusión de membranas, la endocitosis y la exocitosis, o la fisión celular. Además, permitiría llegar a comprender las bases mismas del tráfico de proteínas a través de las membranas biológicas e, incluso, los mecanismos íntimos de la señalización celular (Resh, 1999; Vögler et al, 2004).

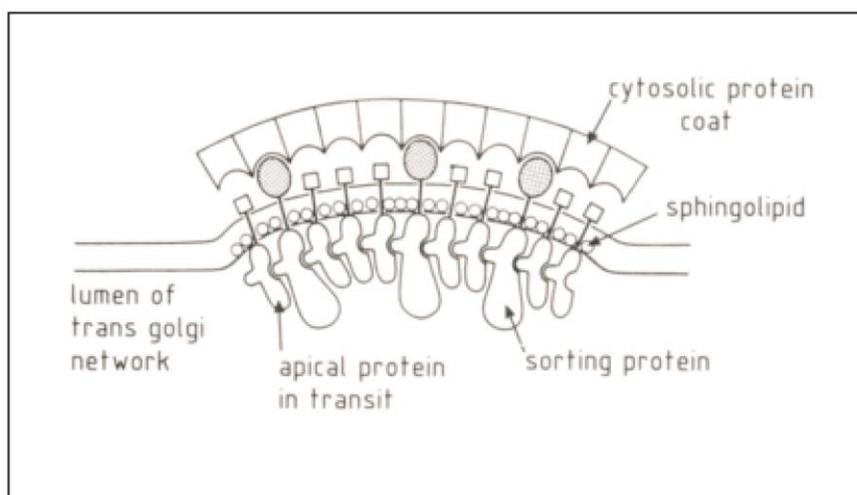
Esta idea original acerca de la existencia de una información en las proteínas de membrana, que les permita moverse a lo largo de las membranas biológicas de una manera concreta, y no aleatoria, lejos de la dinámica browniana, es pilar fundamental de esta tesis. Como también lo es la nueva visión de la proteína de membrana como elemento estabilizador-desestabilizador de la bicapa lipídica (Gruner, 1985; Epanand et al, 1996; Escribá, 2006).

### **1.1.3. Dominios con estructura líquido-ordenada (L<sub>o</sub>) y dominios de tipo “raft”.**

La hipótesis de los “rafts” lipídicos fue propuesta inicialmente para tratar de explicar un fenómeno biológico con importantes implicaciones funcionales: el agrupamiento o asociación preferencial de ciertos lípidos dentro de las células vivas (Lingwood et al, 2009). Este fenómeno alcanza su mayor expresión en células epiteliales fuertemente polarizadas, en cuya membrana plasmática se distingue una zona apical separada de una zona basolateral. La zona apical está enriquecida en glucoesfingolípidos, mientras que el dominio basolateral lo está en el glicerofosfolípido PC (Simons & van Meer, 1988; Simons & Ikonen, 1997).

En un análisis más profundo de la idea de segregación lipídica, ese enriquecimiento apical de glucoesfingolípidos debía de implicar que los lípidos se separaran en el plano de la membrana en algún momento de su trayecto hacia sus respectivos dominios, desde su lugar de síntesis (Lingwood et al, 2009). Simons y van Meer pensaron entonces que los glucoesfingolípidos recién sintetizados podían agruparse en la hoja luminal de la membrana del aparato de Golgi, constituyendo microdominios (figura 1-1-4). La propiedad de los glucoesfingolípidos para interactuar entre ellos a través de numerosos puentes de hidrógeno, constituyó el mecanismo fundamental en el que se apoyaron estos autores para explicar el agrupamiento de lípidos y, por tanto, la formación de dominios (Simons & van Meer, 1988).

A partir de esta primera definición de “raft”, numerosas revisiones del concepto han tenido lugar paralelamente a los avances tecnológicos en biofísica, lipidómica y biología molecular. No obstante, la hipótesis inicial de una agrupamiento en la membrana del aparato de Golgi de los glucoesfingolípidos recién sintetizados, junto con esteroides, ha ido cobrando cada vez más fuerza a la luz de los últimos trabajos (Klemm et al, 2009).



**Figura 1-1-4. Representación esquemática de la organización lipídica propuesta para la membrana de la red trans del Golgi en 1988.** Los esfingolípidos se agruparían en la hoja luminal de la bicapa. Proteínas apicales que van a ser transportadas a la membrana plasmática se representan agrupadas en el lado luminal, interactuando las unas con las otras y con proteínas de agrupamiento. Éstas, a su vez, atravesarían la membrana y formarían una especie de plataforma, en el lado citosólico, necesaria para el establecimiento de una cobertura proteica que estabilizaría el dominio. En este modelo, se asume que la curvatura de la membrana que da lugar a la vesícula es inducida por la estructura de la proteína de recubrimiento del lado citosólico-(figura adaptada de Simons, K & van Meer, G (1988) *Biochemistry*, **27**: 6197-6202).

La importancia funcional de los “raft” adquiere todavía mayor dimensión si se tiene en cuenta su interacción específica con proteínas. Así, proteínas que presentan doble

acilación por cadenas de ácidos grasos saturados, proteínas con un anclaje lipídico del tipo glucosilfosfatidilinositol (GPI), portador de dos colas hidrocarbonadas saturadas, y determinadas proteínas transmembrana, muestran una asociación preferencial a dominios de tipo “raft” (Casey, 1995; Simons & Ikonen, 1997).

En resumen, la compartimentalización de las membranas en dominios de tipo “raft” refleja una arquitectura de membrana compleja y no aleatoria, no referida única y exclusivamente a los lípidos, sino también a las proteínas de membrana. Del mismo modo, esta arquitectura estaría orientada a organizar la funcionalidad dentro de la bicapa, no sólo en lo que respecta al tráfico de lípidos, sino en lo relativo a cualquier bioactividad que tenga lugar en ella (Lingwood & Simons, 2010).

### **Definición de “raft” lipídico.**

Los “rafts” lipídicos son actualmente definidos como agrupaciones dinámicas de lípidos que tienen lugar a una escala de nanómetros, enriquecidos en esteroides y esfingolípidos, que se asocian y se disocian en un rango de tiempo inferior al segundo (Lingwood et al, 2009).

### **Mecanismos moleculares implicados en la constitución de dominios de tipo “raft”.**

Un desarrollo sustancial del concepto de “raft” se produjo paralelamente al avance en el estudio de sistemas de membranas modelo, con el descubrimiento en los años ochenta de la separación de una fase lipídica de elevado ordenamiento, denominada líquido-ordenada ( $L_o$ ), de otra fase más desordenada, denominada líquido-desordenada ( $L_d$ ). Ésta era una segregación dependiente del colesterol, en la que la planaridad del anillo de esterol rígido favorecía la interacción del colesterol con las cadenas hidrocarbonadas más rectas de los lípidos saturados, frente a las especies lipídicas insaturadas, estructuralmente más voluminosas e irregulares. Se vio también que la interacción con el colesterol forzaba a las cadenas hidrocarbonadas de su vecindad a adoptar conformaciones más extendidas, incrementándose en esa región el espesor de la membrana y promoviendo, a su vez, una mayor segregación lipídica debida a incompatibilidades de tipo hidrofóbico entre lípidos. De esta manera, los esfingolípidos

constituían un complemento de unión perfecto con el colesterol, merced a sus largas cadenas hidrocarbonadas saturadas y a su mayor potencial asociativo con el colesterol y otros esfingolípidos a través de puentes de hidrógeno (Brown & London, 1997; Lingwood & Simons, 2010). El resultado en membranas modelo, cuando estaban presentes estas dos especies lipídicas, era la formación de un dominio  $L_o$ , enriquecido en colesterol y esfingolípidos, con un alto grado de compactación lipídica y de mayor grosor que el otro dominio presente, de tipo  $L_d$  (Lingwood et al, 2009; Lingwood & Simons, 2010).

El comportamiento descrito en sistemas de membranas modelo parecía guardar una estrecha relación con lípidos de tipo “raft” en células vivas. Así, se llegó a sugerir que la coexistencia de fases líquidas inmiscibles *in vitro* constituía el principio físico que regía la formación de “rafts” lipídicos *in vivo* (Lingwood & Simons, 2010). Técnicas avanzadas de microscopía ponen de manifiesto la importancia de la asociación entre colesterol y esfingolípidos en la constitución de “rafts” en membranas biológicas (Eggeling et al, 2009). Sin embargo, el comportamiento de estos lípidos en membranas modelo no es visto como la prueba definitiva de lo que ocurre *in vivo*, sino como una pauta para entender mejor cómo puede originarse la heterogeneidad lateral en membranas celulares (Lingwood & Simons, 2010).

Parámetros de ordenamiento lipídico, que tan fácilmente pueden determinarse en membranas modelo, parecen mostrar valores distintos según se refieran a membranas modelo o a membranas biológicas (Kaiser et al, 2009). Las restricciones físicas que parecen darse en dominios  $L_o$  *in vitro*, y que limitan la localización de determinadas proteínas en esos dominios, no aparecen en los dominios de tipo “raft” *in vivo* en membranas biológicas (Kalvodova et al, 2005). Todo esto plantea un nuevo escenario, donde se consideran no sólo las interacciones lípido-lípido, sino también las interacciones lípido-proteína. Así, a las propiedades de asociación específica de ciertos lípidos, como sería el potencial ensamblaje de colesterol y esfingomielina, para constituir un núcleo de conexión de tipo “raft”, hay que añadir la capacidad moduladora de proteínas interaccionando específicamente. En este contexto, la heterogeneidad de membrana basada en la existencia de “rafts” sería el resultado de un acoplamiento de asociaciones químicas específicas a las preferencias de orden físico de lípidos y proteínas (Lingwood & Simons, 2010).

#### **1.1.4. La organización de los lípidos aniónicos en las bicapas lipídicas y su relevancia biológica.**

La fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE) son más abundantes en la monocapa interna de la membrana plasmática (Rothman & Lenard, 1977; Hope & Cullis, 1979). Es con esta parte de la membrana con la que interaccionan directamente importantes proteínas de diferentes complejos de transducción de señal que reciben mensajes de receptores de membrana y las propagan hacia el interior celular.

En el nuevo contexto de la asimetría lateral de las membranas biológicas, se plantea la cuestión acerca del lugar que ocupan en su organización los lípidos aniónicos, tales como el fosfatidilglicerol (PG), el ácido fosfátídico (PA), PS o los fosfatidilinositoles.

El estudio detallado de las propiedades estructurales de sistemas complejos de membranas modelo, compuestos de PS, ha revelado el importante papel modulador de la estructura que ejerce este lípido. Prueba de ello es su capacidad para actuar como elemento estabilizador o desestabilizador de la estructura de bicapa, bajo la influencia de cationes divalentes. El calcio es capaz de inducir segregación lateral de PS y, en menor medida, otros cationes divalentes como el bario, el estroncio y el magnesio (Ohnishi & Ito, 1974).

Como consecuencia del agrupamiento de PS, pueden llegar a manifestarse fases de tipo no lamelar  $H_{II}$  en aquellos sistemas donde exista una predominancia de PE (Hope & Cullis, 1979). De hecho, la propia PS podría estar formando parte de esas estructuras no lamelares, dada su propensión a formarlas bajo condiciones de repulsión electrostática interlipídica reducida (Matsuzaki et al, 1998). Incluso, de manera teórica, se ha llegado a predecir la existencia de fases  $H_{II}$ , energéticamente más favorables, en sistemas de membranas con un 60% de PS, sin neutralización alguna del lípido (Kirk et al, 1984).

Esta influencia de PS en las propiedades estructurales de diferentes membranas modelo, más o menos complejas, junto con su más que probable implicación en interacciones de tipo electrostático, debido a la mayor densidad de carga negativa de su cabeza polar, otorgan a este lípido y a otros lípidos aniónicos, una notable relevancia funcional en eventos biológicos clave. Eventos tales como los ya mencionados procesos de fusión y fisión de membranas (Wilschut et al, 1981), la formación de poros de

membrana (Matsuzaki et al, 1998), o los fenómenos de transducción de señal (Murray et al, 2001; Barceló et al, 2007).

A partir de los planteamientos enunciados en estas páginas introductorias, se podría llegar a entender la naturaleza de esos eventos fundamentales para la vida, en términos del papel recíproco que lípidos y proteínas juegan en la heterogénea organización de las membranas biológicas. Así, la diferente distribución de lípidos constituyendo diversos microdominios de membrana, cada uno con un grado de ordenamiento, una fluidez, un nivel de densidad de carga determinados, estaría condicionando fuertemente la localización de una proteína o un péptido que se hallaran en estrecha interacción con la bicapa lipídica. Y a la inversa. Un péptido o una proteína que estuvieran unidos a una membrana lipídica, ejercerían una influencia sobre su entorno lipídico, modulando la organización espacial de los lípidos dentro de ese sistema (Polozov et al, 1997; Matsuzaki et al, 1998; Escribá, 2006; Barceló et al, 2007).

### **1.1.5. Las proteínas G y la transducción de señales.**

En la membrana plasmática, tienen su origen vías de señalización celular muy importantes que se activan en respuesta al estímulo originado por un mensajero primario, ya sea una hormona, un neurotransmisor, una molécula odorante o un factor de crecimiento. Los receptores de membrana pueden clasificarse de acuerdo con los mecanismos implicados en la transmisión de la señal al interior celular. Según esta clasificación, se subdividen en *receptores de canal*, *receptores con actividad enzimática* y *receptores acoplados a proteínas G* (RAPG) (García Sevilla, 1996).

Las señales transmitidas por RAPG se amplifican en la membrana merced a la acción conjunta de tres elementos fundamentales en la ruta de señalización: un receptor de membrana (RAPG), una molécula transductora (proteína G) y una proteína efectora (adenilil ciclasa, fosfolipasa C, canal iónico, etc.). La proteína efectora, modulada por la molécula transductora, es la encargada de regular los niveles citosólicos de segundos mensajeros (p. ej. AMPc,  $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$ , etc.), que transmiten las señales hacia el interior celular. Se ha demostrado que estos tres componentes básicos de las vías de señalización celular más importantes, se ven afectados de manera significativa en su funcionamiento por la estructura lipídica de la membrana (Escribá et al, 1995; Escribá et al, 1997; Kitajka et al, 2002; Alemany et al, 2004; Vögler et al, 2004; Yang et al, 2005).

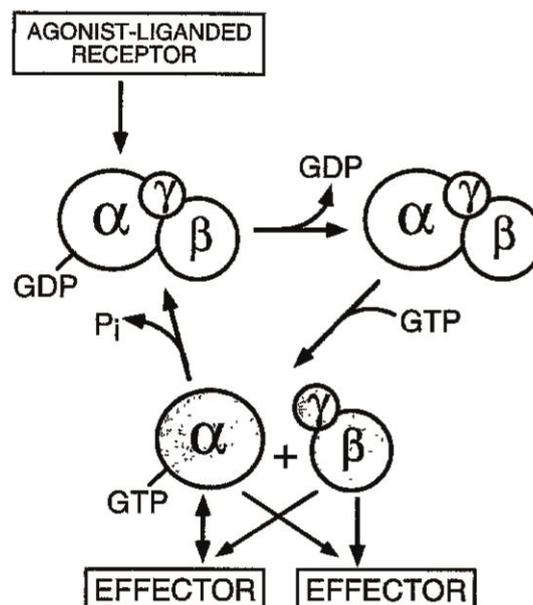
Este extremo es de gran importancia, pues pone de manifiesto la implicación de los lípidos de la membrana plasmática en eventos celulares de primer orden.

Los RAPG constituyen la principal clase de receptores de membrana y forman la familia génica más amplia conocida en el genoma humano. Se estima que forman aproximadamente el 2% de los genes presentes en el genoma de mamíferos. Estos receptores son activados por una amplia variedad de ligandos, incluyendo neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento, moléculas odorantes y luz. Todos los RAPG presentan una estructura terciaria común, consistente en siete dominios transmembranales unidos por dominios extracelulares e intracelulares, con el extremo amino-terminal extracelular y el extremo carboxi-terminal intracelular. Tras la unión de agonistas, los RAPG activados interactúan con uno o más miembros de proteínas reguladoras, de estructura heterotrimérica, que unen nucleótidos de guanina (conocidas como proteínas G). Una vez activadas, las proteínas G llevan la información recibida por el receptor a efectores celulares específicos, como enzimas y canales iónicos. Las enzimas efectoras generan segundos mensajeros intracelulares que regulan una amplia variedad de procesos celulares incluyendo el crecimiento y la diferenciación celular. Así, la transducción de señales vía proteínas G representa uno de los más importantes mecanismos de señalización (Morris & Malbon, 1999). Las tres subunidades diferentes de la proteína G, las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , se encuentran unidas en un estado inactivo, cuando están formando parte del complejo heterotrimérico. En este estado, la subunidad  $\alpha$  une GDP con alta afinidad y esta interacción es estabilizada por el dímero  $G\beta\gamma$ . La proteína G es una proteína periférica que se halla unida a la membrana. Para que pueda tener lugar la transducción de la señal que llega a la célula, la proteína transductora ha de cumplir las siguientes condiciones:

- i) la proteína G debe estar unida a la membrana plasmática
- ii) debe estar situada en las proximidades del receptor al que se acopla
- iii) y, además, debe estar en exceso molar respecto al receptor

Así pues, las interacciones proteína G-lípido son muy importantes en las cascadas de señalización celular, dado que por una parte intervienen en la unión de la proteína a la membrana y, por otra parte, regula la aproximación entre el transductor y el receptor o el efector. Las bases moleculares de estas interacciones son, sin embargo, poco conocidas. El presente trabajo se centra precisamente en el estudio de este punto crucial para la propagación de la señal, analizando el papel de la estructura de la proteína G y de la composición de la membrana en dichas interacciones.

Cuando se produce la unión receptor-ligando, tiene lugar un cambio conformacional en la subunidad  $G\alpha$  que permite el intercambio de GDP por GTP. Esto da lugar a la disociación del monómero  $G\alpha$ -GTP del dímero  $G\beta\gamma$ . Ambas entidades son capaces de modular la actividad de diferentes efectores específicos, tales como adenilil ciclasa, fosfolipasa C, canales iónicos, o las kinasas que se asocian a receptores acoplados a proteínas G (GRKs). Las subunidades  $\alpha$  de la proteína G poseen una actividad GTPasa lenta, que hace que la proteína pase de nuevo a un estado inactivo al hidrolizar GTP, que se transforma en GDP. En este estado,  $G\alpha$ -GDP se asocia fácilmente con  $G\beta\gamma$ , completándose de esta manera el ciclo (figura 1-1-5) (Neer, 1995; Wall et al, 1995). Tanto el intercambio de GDP por GTP como la hidrólisis de GTP son procesos facilitados por proteínas denominadas GEF y GAP, respectivamente.



**Figura 1-1-5. El ciclo regulador de las proteínas G heterotriméricas.** Ver texto para una descripción del ciclo. Los círculos claros representan estados inactivos de las distintas subunidades; los círculos sombreados representan formas activas (figura adaptada de Neer, E.J. (1995) *Cell*, **80**: 249-257).

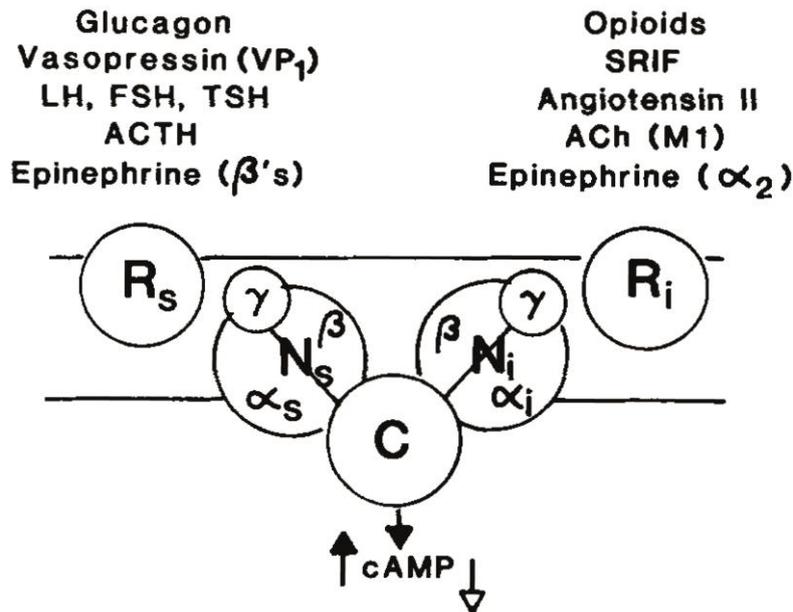
Una característica importante del sistema RAPG-proteína G-efector es la amplificación de la señal inicial. Una unidad de RAPG activada por un agonista puede, a su vez, activar decenas o centenares de moléculas de proteína G, cada una de las cuales puede activar efectores que producen un elevado número de moléculas de mensajero secundario. El resultado neto puede dar lugar a que una sola molécula de agonista genere más de un millón de moléculas de mensajero secundario. Al final del proceso se

obtiene una respuesta celular compleja frente al estímulo inicial del agonista, que puede implicar, por ejemplo, activaciones o inhibiciones de enzimas clave y modificaciones en la expresión de determinados genes.

### **El sistema de la adenilil ciclasa.**

El estudio del sistema de la adenilil ciclasa ha permitido comprender mejor la influencia de la estructura de la membrana sobre los tres componentes clave situados al principio de las cascadas de señalización más importantes. Este sistema está presente en muchas formas de vida y es utilizado por un buen número de receptores. Emplea la formación del segundo mensajero AMP cíclico (AMPc) como mecanismo de transmisión de la señal al interior celular (mensajero secundario). El AMPc se genera a partir de ATP por acción de la enzima de membrana adenilil ciclasa y se inactiva, transformándose en AMP, por acción de la enzima fosfodiesterasa de AMPc. Todas las acciones de este segundo mensajero, desde sus conocidos efectos reguladores de importantes vías metabólicas hasta sus acciones específicas en el sistema nervioso central, son consecuencia de su capacidad para activar la proteína quinasa A (PKA).

El sistema de la adenilil ciclasa se compone de tres proteínas de membrana: 1) un RAPG, que une de forma específica neurotransmisores u hormonas que circulan por el espacio extracelular; 2) una proteína G activada por el complejo ligando-receptor, y 3) un sistema efector, que en este caso es la adenilil ciclasa y cuya actividad es regulada por la proteína G. El aumento en los niveles de AMPc, inducido por la proteína Gs, activa proteínas quinasa de distinta naturaleza, lo cual se traduce finalmente, mediante procesos de fosforilación, en cambios en la función celular. Existe también una vía muy similar a la de estimulación de la adenilil ciclasa, pero cuyo resultado final es la inhibición de dicha actividad. En este sistema, los ligandos se unen a su receptor específico y el complejo ligando-receptor activa una proteína G, llamada proteína Gi, cuya función reguladora consiste en disminuir la actividad del componente catalítico y, por consiguiente, reducir los niveles intracelulares de AMPc (figura 1-1-6).



**Figura 1-1-6. Modelo de 1984 en el que se representan la estimulación y la inhibición de la enzima adenilil ciclasa ("C" en el esquema), mediadas por los respectivos componentes reguladores estimulador (N<sub>s</sub>) e inhibidor (N<sub>i</sub>).** Por primera vez, cada proteína G aparece representada en su forma heterotrimérica. Las dos rutas de señalización se hallan bajo el control de una variedad de receptores sensibles a distintos estímulos hormonales, según el tipo de tejido o de célula en los que se expresen adenilil ciclasas funcionales (figura adaptada de Hildebrandt, J.D. et al. (1984) *J Biol Chem*, **259**: 2039-2042).

Este trabajo se centra en el estudio de la proteína G<sub>i</sub>, componente clave de los sistemas de señalización constituidos por receptores α<sub>2</sub>-adrenérgicos y, también, de aquéllos constituídos por receptores colinérgicos M<sub>2</sub>-muscarínicos. Entre la amplia diversidad de proteínas G<sub>i</sub> conocidas, se ha visto que el oligómero que contiene la subunidad Gα<sub>i1</sub> es capaz de inhibir eficazmente la adenilil ciclasa. Las nueve isoformas de la adenilil ciclasa son estimulas por la subunidad Gα<sub>s</sub>, y la mayoría de estas isoformas son inhibidas por subunidades α de la familia G<sub>i</sub>, con la excepción de la isoforma de tipo II (Simonds, 1999).

## **1.1.6. Bases moleculares de la interacción entre la proteína G y la membrana.**

### **Las modificaciones lipídicas de las proteínas G heterotriméricas.**

Cuando se dedujeron las secuencias de aminoácidos de las primeras subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de las proteínas G identificadas, los investigadores observaron una característica curiosa: ninguna de ellas mostraba un claro dominio hidrofóbico que pudiera explicar la interacción de la proteína G con la membrana plasmática. Se sabía que una estrategia que utilizaban algunas proteínas para interaccionar de forma estable con las membranas consistía en la unión covalente de un lípido al polipéptido. Se iniciaron así los primeros estudios acerca de las modificaciones postraduccionales de las subunidades  $\alpha$  de la proteína G. Estos estudios demostraron que una molécula de un ácido graso de 14 átomos de carbono, el ácido mirístico, se incorporaba de forma irreversible al aminoácido glicina, situado en el extremo amino-terminal de la proteína, a través de un enlace amida. En realidad, la incorporación de ácido mirístico a la proteína ocurre durante el proceso de traducción proteica, y no después, por lo que se trata de una modificación co-traducciona. Además, sólo algunos tipos de subunidad  $\alpha$  sufren miristoilación: concretamente, las subunidades  $\alpha$  de la familia  $G_i$  (Escribá et al, 2007).

Se ha visto que también el ácido palmítico puede incorporarse a la subunidad  $\alpha$  (Buss et al, 1987). De hecho, todas las proteínas  $G_\alpha$  de mamíferos, a excepción de  $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha_{gus}}$ , sufren palmitoilación. El ácido palmítico, de 16 átomos de carbono, se incorpora a la proteína después de la traducción (modificación proteica post-traducciona), mediante la unión a un aminoácido cisteína, a través de un enlace tioéster (Escribá et al, 2007). Así pues, las proteínas  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha o}$  y  $G_{\alpha z}$  tienen un motivo amino-terminal constituido por dos ácidos grasos saturados dispuestos en tándem; un diseño de gran relevancia fisiológica, como se demuestra en éste y otros trabajos (Moffett et al, 2000).

Un aspecto particularmente importante de la palmitoilación es que se trata de un proceso reversible. Se ha visto que la activación de proteínas  $G_\alpha$  por RAPG acelera el ciclo de palmitoilación y depalmitoilación de la proteína transductora de señal, habiendo una relación entre el estado de activación de la proteína y su estado de palmitoilación (Degtyarev et al, 1994). La incorporación y pérdida del ácido palmítico

en las proteínas G, asociado a redistribución celular de las mismas, evidencia que este fenómeno de palmitoilación proteica juega un importante papel regulador en el proceso de señalización celular (Degtyarev et al, 1994; Escribá et al, 2007). Los resultados expuestos en este capítulo arrojan algo más de luz acerca de los mecanismos moleculares que permiten entender mejor este fenómeno, desde la perspectiva de las interacciones entre los lípidos de la membrana y las proteínas G. Este trabajo de investigación contribuye a profundizar aún más en el estudio de esas interacciones.

Otras investigaciones han demostrado que además existe prenilación de la subunidad  $\gamma$ , mediante unión covalente de una molécula de farnesilo o de geranilgeraniol a la cisteína del motivo carboxiterminal CaaX (donde C=cisteína, a=aminoácido aromático, X=cualquier aminoácido) (Mumby et al, 1990). Si el residuo X es serina o metionina, la cisteína se farnesila. En cambio, si ese último residuo es leucina, entonces la proteína es geranilada (Marrari et al, 2007).

La isoprenilación de proteínas  $G\gamma$  es un proceso postraduccional que tiene lugar en el citosol. La proteína  $G\gamma$  isoprenilada, y unida a  $G\beta$ , se transloca al retículo endoplásmico, donde tiene lugar la proteólisis de los últimos tres aminoácidos por la proteasa “Ras Converting Enzyme” (RCE). Finalmente, la cisteína isoprenilada es metilada mediante el enzima isoprenilcisteín-carboxil-metiltransferasa (Icmt). Esta metilación carboxi-terminal aumenta notablemente la hidrofobicidad de esa región. Aunque aún no está claro el significado biológico último de esta modificación, la carboximetilación de proteínas  $G\gamma$  es muy importante para la interacción del dímero  $G\beta\gamma$  con membranas lipídicas; sobre todo, en aquellos casos en los que la proteína  $G\gamma$  es portadora de un grupo farnesilo (Bhatnagar & Gordon, 1997; Marrari et al, 2007).

Todas estas modificaciones son críticas para la unión de cada una de las subunidades a membranas (Jones et al, 1990; Muntz et al, 1992). En estas modificaciones posttraduccionales parece estar pues una de las claves de la unión de proteínas G a membranas.

**Tabla 1-1-1. Modificaciones lipídicas de las proteínas G heterotriméricas (tabla adaptada de Escribá et al, 2007).**

$G\alpha$	Modificación lipídica	Lugares de la modificación <sup>a</sup>
$\alpha_s, \alpha_{olf}$	Palmitoilación y N-palmitoilación <sup>b</sup>	$\alpha_s$ M <u>G</u> <b>C</b> LGNSKT-
$\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{16}$	Palmitoilación (2 ó más sitios)	$\alpha_q$ MTLESIMA <b>C</b> CLSEEA- $\alpha_{16}$ MARSLRWR <b>C</b> CPW <b>C</b> L <sup>c</sup>
$\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}, \alpha_o, \alpha_z$	Miristoilación y palmitoilación	$\alpha_{i1}$ M <u>G</u> <b>C</b> TLSAED-
$\alpha_{t1}, \alpha_{t2}, \alpha_{gust}$	Miristoilación	$\alpha_{t1}$ M <u>G</u> AGASAE-
$\alpha_{12}, \alpha_{13}$	Palmitoilación ( $\alpha_{12}$ = 1 sitio; $\alpha_{13}$ = 2 sitios)	$\alpha_{12}$ MSGVVRTL <b>S</b> R <b>C</b> LLPAE- $\alpha_{13}$ MADFLPSRSVLSV <b>C</b> FP <b>G</b> <b>C</b> V-
$G\gamma$	Modificación lipídica <sup>d</sup>	Lugares de la modificación <sup>e</sup>
$\gamma_1, \gamma_9, \gamma_{11}$	Farnesilación	$\gamma_1$ -KNPFKELKGG <b>C</b> <u>VIS</u>
$\gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \gamma_5, \gamma_7, \gamma_8, \gamma_{10}, \gamma_{12}, \gamma_{13}$	Geranylgeranilación	$\gamma_2$ -ENPFREKKFF <b>C</b> <u>AIL</u>

<sup>a</sup>Se muestran las regiones N-terminales de diferentes proteínas  $G\alpha$ . Los residuos glicina subrayados representan sitios de N-miristoilación o N-palmitoilación (para  $\alpha_s$ ) tras la eliminación de la metionina inicial. Residuos cisteína resaltados en negrita representan sitios de palmitoilación a través de la formación de enlaces tio-éster.

<sup>b</sup>No se ha comprobado la palmitoilación N-terminal de  $\alpha_{olf}$ .

<sup>c</sup>Residuos cisteína resaltados en negrita representan sitios probables de palmitoilación de  $\alpha_{16}$ .

<sup>d</sup>Aunque todas las proteínas  $G\gamma$  de mamíferos incorporan un grupo isoprenilo sencillo, la proteína  $G\gamma$  de *Saccharomyces cerevisiae*, *Ste18*, incorpora tanto un grupo farnesilo como una molécula de ácido palmítico en su extremo C-terminal.

<sup>e</sup>Se muestran las regiones C-terminales de diferentes proteínas  $G\gamma_2$ . Los residuos cisteína resaltados en negrita representan sitios de isoprenilación. Los residuos subrayados son los tres aminoácidos eliminados por la enzima proteolítica RCE.

## **Estructura lipídica de las membranas y los procesos de transducción de señal.**

La hipótesis de la estructura de membrana, según la cual el tipo de organización estructural de los lípidos en la membrana plasmática tiene importantes efectos funcionales en la célula (Escribá et al, 1995; Escribá, 2006), contribuye a elucidar los mecanismos moleculares fundamentales por los cuales la proteína G interacciona con la membrana plasmática.

Desde mediados de los años ochenta se han venido publicando trabajos que demuestran que el dímero  $G\beta\gamma$  resulta clave en la interacción de proteínas G con membranas modelo. En 1986, Sternweis probó que eran necesarias las subunidades  $\beta\gamma$  para que las subunidades  $\alpha_o$  y  $\alpha_i$  de la proteína G de cerebro bovino pudieran unirse a vesículas de fosfolípidos (Sternweis, 1986). Estudios posteriores demostraron la importancia de la estructura de la membrana en la interacción de proteínas G con membranas. Mediante estudios *in vitro*, se comprueba que modificaciones en la estructura lipídica, tanto de liposomas como de membranas biológicas, modulan la interacción de proteínas G con la membrana, así como la actividad de receptores y proteínas efectoras del sistema de transducción de señales (Escribá et al, 1995; Escribá et al, 1997; Kitajka et al, 2002; Alemany et al, 2004; Vögler et al, 2004; Yang et al, 2005). En este trabajo se amplían y extienden estos estudios de interacción proteína-membrana, mediante el uso de proteínas G purificadas, con mutaciones puntuales sencillas o múltiples, y membranas modelo que simulan distintos dominios de membrana.

La asimetría de la membrana adquiere importante significado biológico en el contexto de la hipótesis de la estructura de la membrana. Las membranas celulares son ricas en el lípido propenso a formar estructuras no lamelares PE, que se localiza principalmente en la cara citosólica de la membrana plasmática. La tensión de curvatura negativa que se genera como consecuencia de la existencia de dominios ricos en PE, tendría pues importantes implicaciones en la señalización celular, al actuar como reservorios de membrana para proteínas G (Rothman & Lenard, 1977; Vögler et al, 2004). La distribución transversal no uniforme de lípidos en las membranas biológicas es importante para las células: la pérdida de esta asimetría está vinculada a apoptosis, coagulación sanguínea y una amplia variedad de alteraciones de la salud (Zwaal et al, 2004).

Las proteínas que interactúan con la membrana también pueden modular la estructura secundaria de los lípidos, de ese modo regulando las propiedades locales de las bicapas lipídicas. Las regiones transmembrana de algunos receptores y los grupos isoprenilo de las subunidades  $\gamma$  de la proteína G incrementan la propensión de las membranas a formar estructuras de tipo no lamelar (van der Wel et al, 2000; Funari et al, 2005). De este modo, en los dominios de membrana en los que se localicen proteínas G, podría existir una mayor tendencia de la membrana a adoptar una estructura no lamelar, que favorecería la presencia de más proteínas G en esa región. Se ha comprobado *in vitro*, por difracción de rayos X, la capacidad de la proteína  $G\gamma$  para generar dominios con una estructura de tipo hexagonal  $H_{II}$  en membranas modelo (Barceló et al, 2007). Tales resultados ponen de manifiesto el gran poder de los grupos farnesilo y geranylgeraniol para inducir fases hexagonales de tipo  $H_{II}$ . *In vivo*, este incremento en la propensión no lamelar de la membrana se traduciría en una compactación menor de la superficie de la membrana, que permitiría a ciertas proteínas afines por estas regiones incorporarse a la membrana. Un ejemplo claro sería la inserción de restos isoprenilos de proteínas  $G\gamma$ , que son voluminosos y tienen poca afinidad por dominios con un empaquetamiento denso de superficie, como ocurre con los “lipid raft”. Todo esto refuerza la idea de las importantes implicaciones funcionales que puede tener la concentración de este tipo de lípidos en puntos concretos de una membrana biológica, como un modo de promover procesos de fusión o de fisión en la bicapa lipídica. De este manera, proteínas de membrana portadoras de estos grupos lipídicos serían capaces de desestabilizar puntos concretos de la membrana (Gruner, 1985).

## 1.2. RESULTADOS

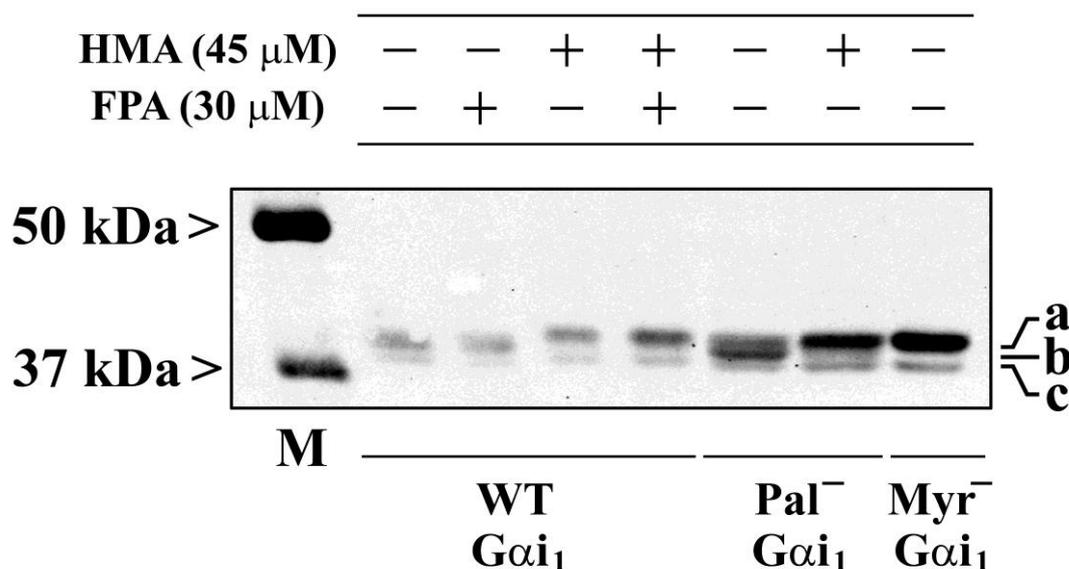
El objetivo de esta parte del trabajo consiste en determinar el papel que juegan las modificaciones lipídicas de la proteína  $G\alpha_i_1$  en su interacción con membranas lipídicas. Asimismo, se trató de determinar el efecto que tienen en esa interacción diferentes tipos de lípidos caracterizados por su abundancia en las membranas biológicas y que serían representantes clave de los principales dominios de esas membranas.

### 1.2.1. Caracterización lipídica de proteínas $G\alpha_i_1$ .

Se produjeron cuatro proteínas  $G\alpha_i_1$  con distinto grado de acilación, mediante mutagénesis dirigida en aminoácidos que son claves para la incorporación de los ácidos grasos saturados al extremo amino de la proteína. Así, se generó una proteína  $G\alpha_i_1$  *WT* que no porta ninguna mutación en su extremo amino-terminal y que por tanto, es capaz de incorporar ácido mirístico y ácido palmítico en esa región. *In vivo*, sólo una fracción de estas proteínas está palmitoilada, por lo que se forzó la palmitoilación *in vitro* para dar lugar a la fracción  $G\alpha_i_1$  *WT*  $Pal^+$ . Además, se generó una proteína  $G\alpha_i_1$  *Pal*<sup>-</sup> que porta una mutación en la cisteína-3 (C3S) y que, por tanto, no es capaz de incorporar el ácido palmítico. Finalmente, se generó una proteína  $G\alpha_i_1$  *Myr*<sup>-</sup> que porta una mutación en la glicina-2 (G2A) y que, consecuentemente, carece de ácido mirístico. Tampoco el ácido palmítico está presente en esta proteína, por haber sido obtenida de una fracción citosólica (Degtyarev et al, 1994, Dunphy et al, 1996; Dunphy et al, 2001).

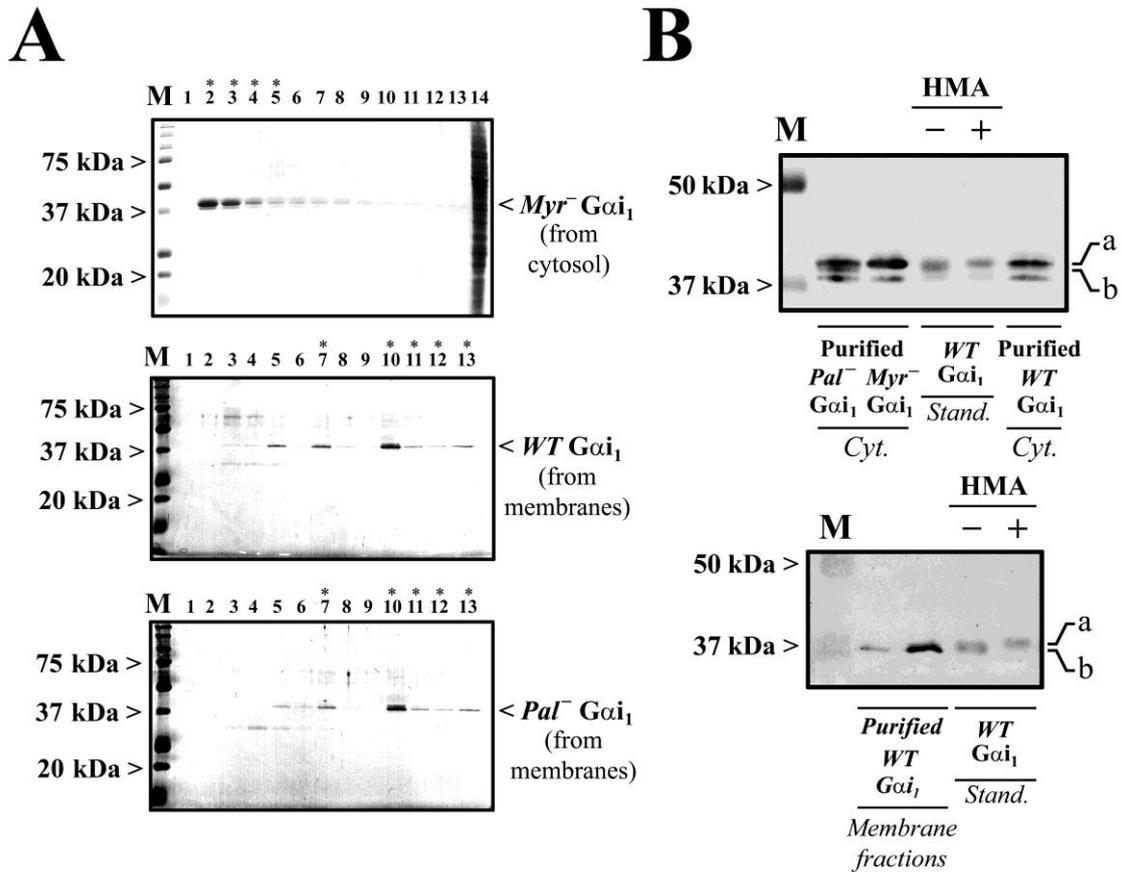
El tratamiento con ácido 2-hidroxi-mirístico de células Sf9 sobreexpresando estas proteínas, ha permitido poner de manifiesto la capacidad de las proteínas  $G\alpha_i_1$  *WT* y  $G\alpha_i_1$  *Pal*<sup>-</sup> para incorporar ácido mirístico (figura 1-2-1). El ácido 2-hidroxi-mirístico es un análogo del ácido mirístico, que actúa en la célula inhibiendo la N-miristoiltransferasa (NMT), el enzima que cataliza la adición de moléculas de ácido mirístico a proteínas. Como consecuencia del tratamiento con HMA, las proteínas  $G\alpha_i_1$  *WT* y  $G\alpha_i_1$  *Pal*<sup>-</sup> no miristoiladas tuvieron una movilidad electroforética ligeramente inferior a la que presentaron sus equivalentes miristoilados. Además, el comportamiento electroforético de las proteínas no miristoiladas fue similar al de la proteína  $G\alpha_i_1$  *Myr*<sup>-</sup>, una proteína incapaz de incorporar ácido mirístico en su secuencia (figura 1-2-1).

El tratamiento de células Sf9 con ácido 2-fluoropalmítico, un inhibidor de la palmitoilación, no tuvo efecto alguno en la movilidad electroforética de la proteína  $G\alpha_i1$  WT (figura 1-2-1). Este resultado está de acuerdo con otros trabajos previos (Jones et al, 1997), que indican que no hay diferencias en cuanto a movilidad electroforética entre una proteína  $G\alpha_i$  miristoilada portadora del ácido palmítico y otra únicamente miristoilada.



**Figura 1-2-1. Movilidad electroforética de las diferentes formas de proteína  $G\alpha_i1$ .** La inhibición de la reacción de miristoilación con ácido 2-hidroximirístico (HMA+), causó un cambio de movilidad electroforética de las proteínas  $G\alpha_i1$  WT y  $Pal^-$  (peso molecular aparente más alto). Las bandas inmunorreactivas correspondientes a proteína no miristoilada se sitúan a la altura de la línea “a”. Por otro lado, las bandas correspondientes a proteína miristoilada están a la altura de la línea “b”. Una tercera banda inmunorreactiva (línea “c”) aparece por debajo de las dos anteriores en la figura. Esta banda podría corresponder a un fragmento proteolítico de  $G\alpha_i1$  (Hurley et al, 1984). Por otra parte, la inhibición de la reacción de palmitoilación (FPA+) no alteró el patrón de movilidad de la proteína  $G\alpha_i1$  WT. La detección inmunológica de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante “western-blot”.

La obtención de proteínas  $G\alpha_i1$  miristoiladas y no miristoiladas mediante los anteriores ensayos de inhibición, ha permitido caracterizar el grado de miristoilación de proteínas  $G\alpha_i1$  recombinantes purificadas a partir de distintas fracciones celulares (figura 1-2-2 A). Así, se ha visto que las proteínas  $G\alpha_i1$  WT y  $Pal^-$ , purificadas a partir de la fracción citosólica de células Sf9, tienen un bajo grado de miristoilación (figura 1-2-2 B, panel

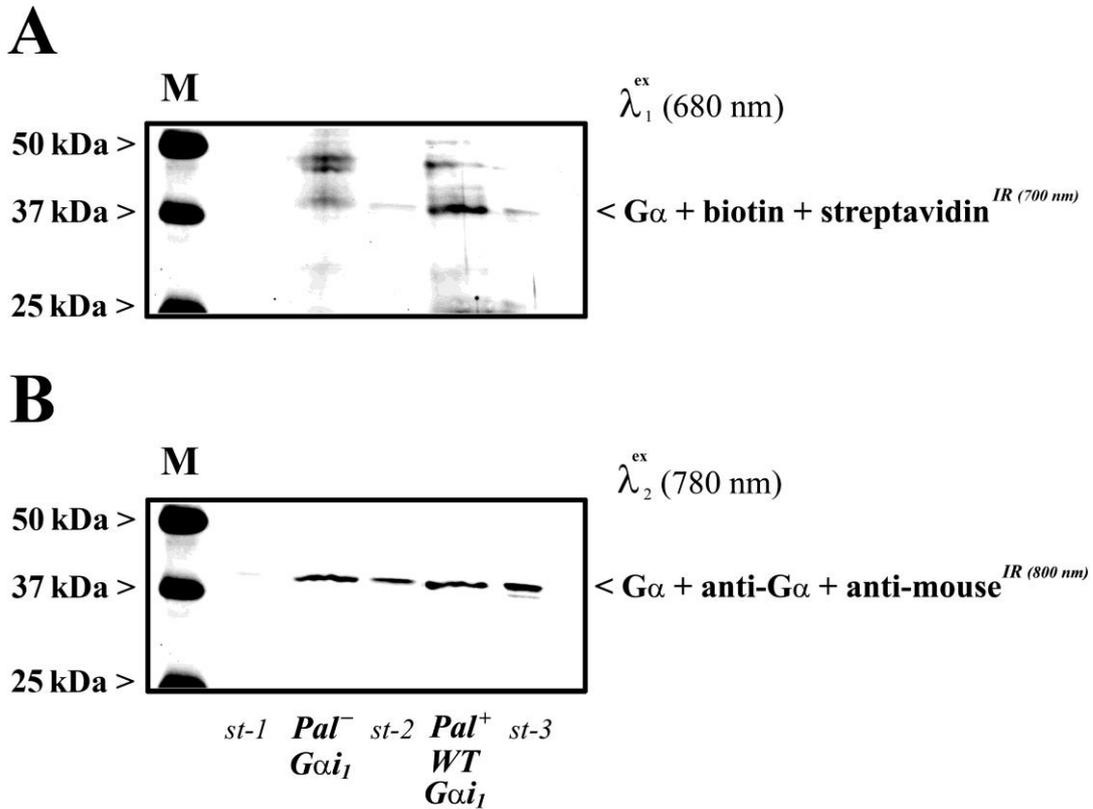


**Figura 1-2-2. Purificación y caracterización lipídica de proteínas Gai<sub>1</sub> recombinantes.** Se analizaron por SDS-PAGE (10% acrilamida) distintas fracciones resultantes de la cromatografía líquida (ver protocolo en “Materiales y métodos”). Aquellas fracciones más enriquecidas en proteína Gai<sub>1</sub> recombinante se unieron para ensayos posteriores (asterisco). *A, panel superior:* patrón de elución de la proteína Gai<sub>1</sub> Myr<sup>-</sup>. La elución de la proteína tuvo lugar aplicando el siguiente gradiente discontinuo de imidazol: 80 mM (calles 1 y 2), 120 mM (calles 3 y 4), 240 mM (calles 5-7) y 300 mM (calles 8-13). En la calle 14 se muestra la fracción citosólica obtenida tras la ultracentrifugación que precede a la purificación en columna Ni-NTA. *A, panel intermedio:* purificación de la proteína Gai<sub>1</sub> WT. La elución de la proteína se llevó a cabo empleando un gradiente de imidazol algo más amplio que el anterior: 40 mM (calles 1 y 2), 80 mM (calles 3 y 4), 120 mM (calles 5 y 6), 240 mM (calles 7-9) y 300 mM (calles 10-13). *A, panel inferior:* patrón de elución de Gai<sub>1</sub> Pal<sup>-</sup>, idéntico al de Gai<sub>1</sub> WT. *B, panel superior:* movilidad electroforética de subunidades Gai<sub>1</sub> Myr<sup>-</sup>, Pal<sup>-</sup> y WT (124, 100 y 112 ng respectivamente de proteína cargada) purificadas de la fracción de sobrenadante (citósol, “Cyt.” en la figura), comparada con la de estándares miristoilados (HMA-) y no miristoilados (HMA+) obtenidos de los ensayos de inhibición de miristoilación (véase “Materiales y métodos” para más detalle). Las bandas inmunorreactivas de proteína Gai<sub>1</sub> no miristoilada se indican con “a”, mientras que las bandas de proteína Gai<sub>1</sub> miristoilada se indican con “b”. *B, panel inferior:* análisis de la movilidad electroforética de una proteína Gai<sub>1</sub> WT purificada de una fracción de membranas totales. Las dos bandas de proteína Gai<sub>1</sub> WT purificada (7 y 22 ng, de izquierda a derecha de la figura) corresponden a proteínas completamente miristoiladas (justo a la altura de la línea b). La detección de las proteínas de interés se llevó a cabo mediante “western-blot”.

superior), mientras que una proteína Gai<sub>1</sub> WT, purificada de una fracción de membranas totales, se halla completamente miristoilada (figura 1-2-2 B, panel inferior).

La unión del ácido palmítico a la cisteína en posición 3 de la proteína Gai<sub>1</sub> es una unión covalente reversible, sensible a agentes reductores. Por ello, el empleo de agentes

reductores durante el proceso de purificación de la proteína  $G\alpha_1$  *WT* podría estar reduciendo la proporción de proteína  $G\alpha_1$  palmitoilada en la muestra final de proteína purificada. Para aumentar esa proporción se llevó a cabo una reacción de palmitoilación *in vitro* de la proteína purificada, empleando palmitoil-CoA a una concentración de 20  $\mu$ M.



**Figura 1-2-3. Acilación de proteína  $G\alpha_1$ .** A, la banda intensa correspondiente a la proteína  $G\alpha_1$  *WT Pal<sup>+</sup>* confirma la incorporación del ácido palmítico en la cisteína-3 de la proteína, lo cual no ocurre en la proteína mutante  $G\alpha_1$  *Pal<sup>-</sup>*. Se cargaron idénticas cantidades de las proteínas  $G\alpha_1$  *Pal<sup>-</sup>* y  $G\alpha_1$  *WT Pal<sup>+</sup>*, como se demuestra por “western-blot” cuantitativo. B, cuantificación de proteína  $G\alpha_1$  total mediante “western-blot”. La cuantificación se hizo usando cantidades conocidas de proteína  $G\alpha_1$ , correspondientes a los estándares *st-1* (54 ng), *st-2* (87 ng) y *st-3* (110 ng).

La incorporación de ácido palmítico a la proteína  $G\alpha_1$  *WT* se demostró mediante un ensayo de biotinylación de la proteína purificada (figura 1-2-3, panel A), incorporándose biotina allí donde había unido ácido palmítico. La detección de proteína biotinylada se realizó utilizando estreptavidina conjugada con un fluorocromo sensible a radiación de 700 nm. El fluorocromo emite radiación infrarroja tras ser estimulado por aquélla. La radiación infrarroja se detectó con un escáner de infrarrojo próximo (*NIR*, “near infrared”). En la figura 1-2-3 se puede ver que la proteína  $G\alpha_1$  *WT*, que ha sido sometida a una reacción de palmitoilación *in vitro*, da una señal muy fuerte debida a la unión estreptavidina-biotina, frente a la débil señal correspondiente a la proteína  $G\alpha_1$

*Pal*<sup>-</sup>. Las cantidades totales de proteína  $G\alpha_i_1$  *Pal*<sup>-</sup> y de proteína  $G\alpha_i_1$  *WT* cargadas en el gel fueron idénticas, como se observa en la figura obtenida empleando un anticuerpo anti- $G\alpha_i_1$  (figura 1-2-3 panel B).

### 1.2.2. Interacciones $G\alpha_i_1$ -membranas.

Para llevar a cabo este estudio, se produjeron cuatro tipos de proteína  $G\alpha_i_1$  con diferente grado de acilación. Estas proteínas  $G\alpha_i_1$  se purificaron mediante cromatografía líquida en columna de Ni-NTA (véase “Materiales y métodos” para más detalles). Las fracciones cromatográficas que se combinaron para estos estudios aparecen marcadas con asterisco en la figura 1-2-2 A. El grupo de proteínas  $G\alpha_i_1$  miristoiladas estuvo constituido por tres tipos de proteínas: una proteína  $G\alpha_i_1$  *Pal*<sup>-</sup> no palmitoilada y dos tipos de proteína  $G\alpha_i_1$  *WT* con diferente grado de palmitoilación. La proteína  $G\alpha_i_1$  *Myr*<sup>-</sup> careció del ácido mirístico N-terminal. Puesto que la ausencia de dicho grupo previene la palmitoilación del monómero  $G\alpha_i_1$  (Duncan & Gilman, 1996), la proteína  $G\alpha_i_1$  *Myr*<sup>-</sup> es también una proteína no palmitoilada. Así, se simplificó la obtención de una proteína  $G\alpha_i_1$  *Myr*<sup>-</sup> *Pal*<sup>-</sup>, no siendo necesario inducir la doble mutación Gly-2→Ala-2 y Cys-3→Ser-3 en el extremo amino de la proteína  $G\alpha_i_1$ .

Se analizó la unión de las distintas proteínas  $G\alpha_i_1$  generadas a diferentes bicapas lipídicas modelo, con las características composicionales y estructurales que simulan diferentes microdominios de membrana. Así, las vesículas compuestas por PC, con una estructura lamelar uniforme, representan la estructura lipídica estándar de las membranas biológicas, puesto que la PC constituye normalmente el 40-50% de la totalidad de los fosfolípidos de membrana. Un lípido pro-no lamelar, como la PE, es clave en la formación de dominios de tipo  $L_\epsilon$  y  $L_d$  con alta propensión a la formación de fases no lamelares (tensión de curvatura negativa) (Escribá, P.V., 2006). PS es un lípido aniónico, con un efecto crítico en la unión de proteínas a membranas por interacciones de tipo electrostático. El colesterol y la esfingomielina son lípidos que tienden a asociarse entre sí, constituyendo dominios con una estructura liquido-ordenada ( $L_o$ ), que se han denominado “lipid rafts”. Los resultados de los estudios de unión de las diferentes proteínas  $G\alpha_i_1$  mencionadas a membranas modelo compuestas por los lípidos descritos, se muestran en la tabla 1-2-1.

**Tabla 1-2-1. Unión de proteínas  $G\alpha_1$  con diferente grado de acilación a membranas modelo.** Los resultados corresponden a medias de 2-8 experimentos de unión de la proteína  $G\alpha_1$  a vesículas lipídicas (tanto por uno)  $\pm$  E.E.M.

<i>Composición lipídica</i>	<i>Proporción de unión de <math>G\alpha_1</math> a LUVs</i>			
	<i>WT <math>PAL^+</math></i>	<i>WT</i>	<i><math>PAL^-</math></i>	<i><math>MYR^-</math></i>
PC	0,321 $\pm$ 0,031	0,220 $\pm$ 0,044	0,177 $\pm$ 0,030	0,023 $\pm$ 0,004
PC:PE (5:5)	0,238 $\pm$ 0,048	0,169 $\pm$ 0,029	0,115 $\pm$ 0,016	0,026 $\pm$ 0,006
PC:PE (2:8)	0,187 $\pm$ 0,030	0,136 $\pm$ 0,018	0,114 $\pm$ 0,017	0,017 $\pm$ 0,003
PC:PS (9:1)	0,299 $\pm$ 0,024	0,219 $\pm$ 0,047	0,186 $\pm$ 0,014	0,022 $\pm$ 0,003
PC:PS (8:2)	0,238 $\pm$ 0,024	0,233 $\pm$ 0,035	0,177 $\pm$ 0,015	0,024 $\pm$ 0,002
PC:PS (6:4)	0,222 $\pm$ 0,026	n.d.	0,278 $\pm$ 0,039	0,023 $\pm$ 0,004
PC:PE:Cho (1:1:1)	0,223 $\pm$ 0,027	0,141 $\pm$ 0,021	0,186 $\pm$ 0,009	0,023 $\pm$ 0,006
PC:PE:Cho:SM (1:1:1:1)	0,249 $\pm$ 0,020	0,190 $\pm$ 0,050	0,139 $\pm$ 0,022	0,022 $\pm$ 0,006
PC:PE:PS (2:2:1)	0,245 $\pm$ 0,031	0,243 $\pm$ 0,021	0,166 $\pm$ 0,033	0,019 $\pm$ 0,003

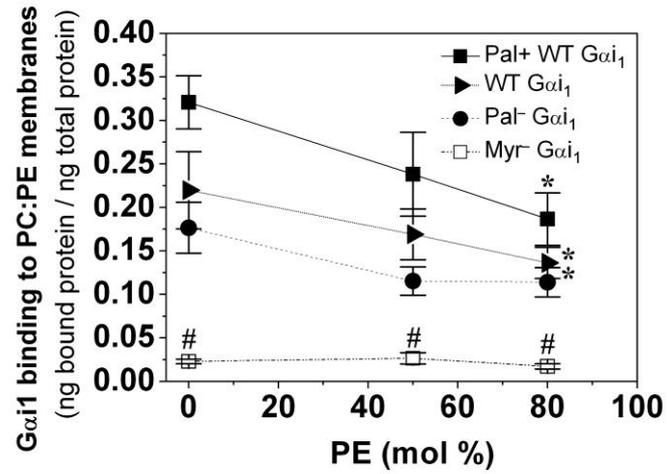
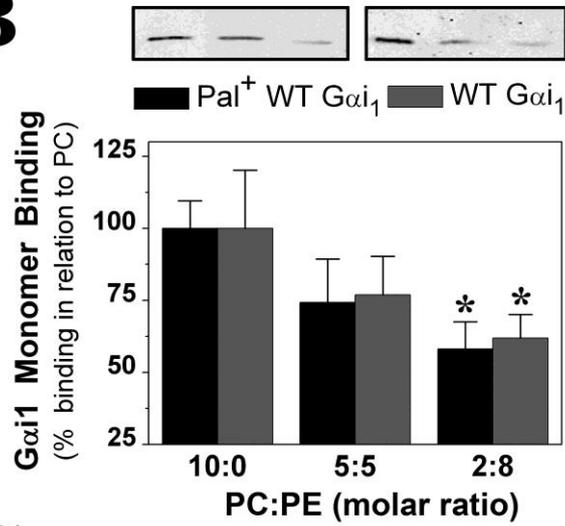
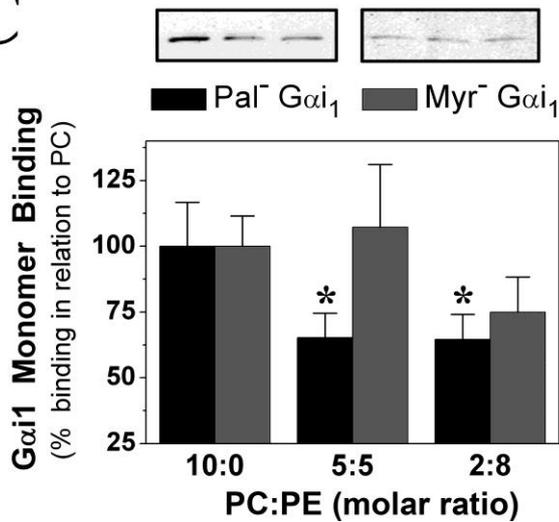
### *Efectos de los lípidos de $G\alpha_1$ en su unión a membranas ricas en PE.*

La unión de la proteína  $G\alpha_1$  a membranas modelo en general, y a membranas de PC en particular, fue dependiente de los ácidos grasos mirístico y palmítico. Así, la proteína que presentó mayor unión a PC fue la proteína  $G\alpha_1$  *WT  $Pal^+$* , seguida de la proteína  $G\alpha_1$  *WT*, no sometida a la reacción de palmitoilación. La proteína  $G\alpha_1$  *Pal<sup>-</sup>* se unió menos que las dos anteriores a vesículas de PC.  $G\alpha_1$  *Myr<sup>-</sup> ( $Pal^-$ )*, sin modificación lipídica que sustentara su unión a tales vesículas, fue prácticamente incapaz de interaccionar con la PC y con el resto de lípidos estudiados.

La miristoilación de proteínas  $G\alpha_1$  indujo, en todos los casos, una reducción en la unión de estas proteínas a vesículas lipídicas con PE, el cual causa la formación de dominios liquido-desordenados (Ld) y fases no lamelares  $H_{II}$  a 25°C. Este efecto correlacionó inversamente con el grado de acilación de la proteína (figura 1-2-4). En este sentido, la proteína  $G\alpha_1$  *WT  $Pal^+$*  fue la más afectada por PE en su interacción con membranas modelo, disminuyendo significativamente su unión a liposomas con un 80% de PE (figuras 1-2-4 A y B). De igual modo, la proteína  $G\alpha_1$  *Pal<sup>-</sup>* mostró menor unión

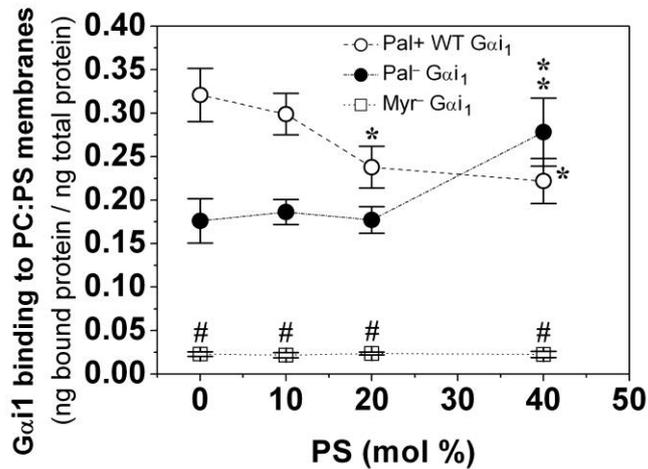
a membranas modelo con PE que a membranas compuestas únicamente de PC (figuras 1-2-4 A y C). Por otro lado, la ausencia de miristoilación de la proteína supuso la pérdida casi total de la capacidad de la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$  para interactuar con vesículas lipídicas (figuras 1-2-4 A y C). Además, la presencia de PE no indujo cambios significativos en la interacción de  $G\alpha_1 Myr^-$  con membranas modelo (figura 1-2-4 C).

**Figura 1-2-4. Influencia de PE en la unión de  $G\alpha_1$  a membranas modelo.** A, unión de proteínas  $G\alpha_1$  con diferente grado de acilación a membranas con contenido creciente en PE (ng de proteína unida respecto a ng totales de proteína  $G\alpha_1$ ). B, porcentaje de unión de  $G\alpha_1 WT$  y  $G\alpha_1 Pal^+$  a vesículas lipídicas con PE. C, porcentaje de unión de proteínas  $G\alpha_1 Myr^-$  y  $G\alpha_1 Pal^-$  a vesículas lipídicas con PE. En B y C, la unión de proteína a membranas de PC se tomó como referencia (100%). Se muestran “immunoblots” representativos de los diferentes experimentos de unión. Los datos que se representan son la media  $\pm$  E.E.M. del porcentaje de unión a membranas de 3-8 experimentos independientes. \*,  $p < 0,05$ . # indica la existencia de diferencias significativas en la unión de la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$  a membranas totales, con respecto a las restantes proteínas  $G\alpha_1$  recombinantes. Se obtuvieron diferencias significativas en la unión de las proteínas  $G\alpha_1 Pal^-$  y  $WT$  a membranas modelo de PE, aplicando un test t de dos muestras no apareadas.

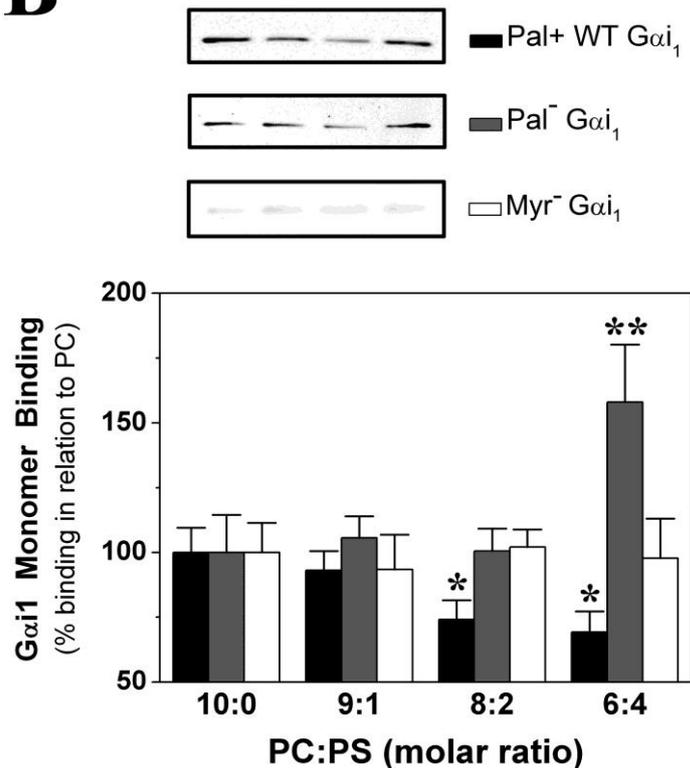
**A****B****C**

*Efectos de los lípidos de Gα<sub>1</sub> en su unión a membranas ricas en PS.*

**A**



**B**



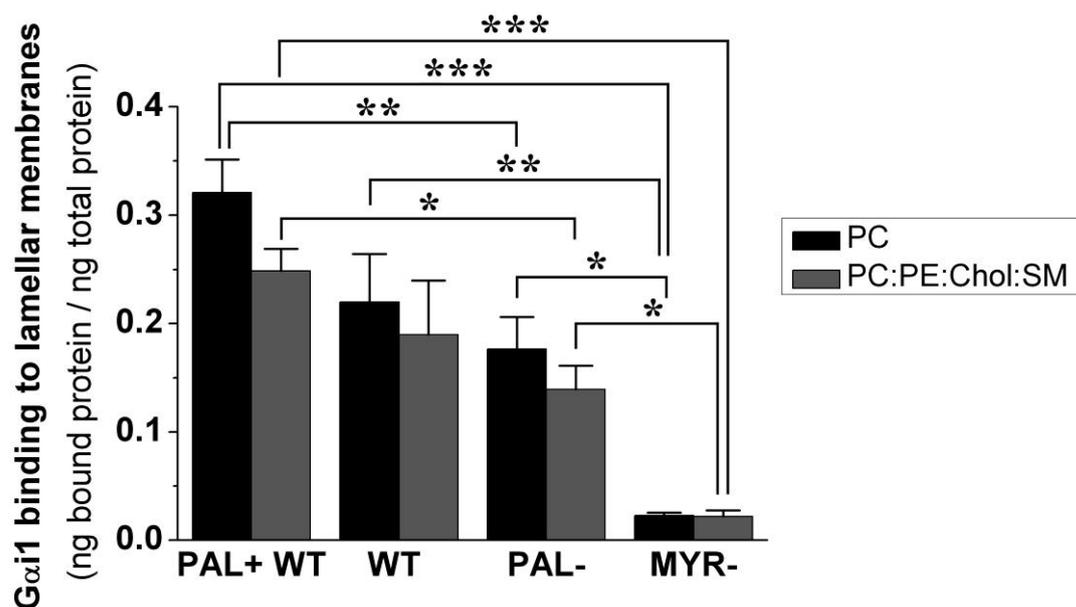
**Figura 1-2-5. Influencia de PS en la unión de Gα<sub>1</sub> a membranas modelo.** A, unión de proteínas Gα<sub>1</sub> con diferente grado de acilación a membranas con contenido creciente en PS (ng de proteína unida respecto a ng totales de proteína Gα<sub>1</sub>). B, porcentaje de unión de Gα<sub>1</sub> Pal<sup>+</sup>, Gα<sub>1</sub> Pal<sup>-</sup> y Gα<sub>1</sub> Myr<sup>-</sup> a membranas modelo con cantidades variables de PS. Se tomó como referencia (100%) la unión a membranas de PC. Se muestran “immunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los datos representan la media ± E.E.M. del porcentaje de unión a membranas (n=2-9). \*\*, *p* < 0,01; \*, *p* < 0,05. # indica la existencia de diferencias significativas en la unión de la proteína Gα<sub>1</sub> Myr<sup>-</sup> a membranas modelo, con respecto a las restantes proteínas Gα<sub>1</sub> recombinantes.

La fosfatidilserina (PS) es un lípido con carga neta negativa y abundante en la cara interna de la membrana plasmática. La palmitoilación de la proteína  $G\alpha_1$  miristoilada alteró su comportamiento de unión a membranas lipídicas modelo con proporciones crecientes de PS (figura 1-2-5). Así, la proteína  $G\alpha_1$  *WT Pal<sup>+</sup>*, miristoilada y palmitoilada, mostró menor afinidad por membranas con contenido creciente en PS, mientras que la unión de la proteína  $G\alpha_1$  *Pal<sup>-</sup>*, miristoilada pero no palmitoilada, a vesículas con 40% de PS se vio notable y significativamente incrementada (figura 1-2-5).

Finalmente, la unión de la proteína  $G\alpha_1$  *Myr<sup>-</sup>* no acilada a vesículas de PS fue también, como en el caso de PE, muy baja, no observándose cambios significativos debidos a un aumento en el contenido en PS de las membranas lipídicas. La proteína  $G\alpha_1$  *Myr<sup>-</sup>*, al no llevar unido el ácido mirístico, cambiaría su orientación respecto al plano lateral de tales membranas, lo que explicaría que no se produjera una mayor o menor interacción en presencia de cantidades crecientes de PS (ver Figura 1-2-8).

#### ***Efectos de los lípidos de $G\alpha_1$ en su unión a membranas de tipo “lipid-raft” ( $L_o$ ).***

Las vesículas lipídicas constituidas por PC se hallan en un estado fluido denominado líquido-desordenado ( $L_d$ ). En cambio, en las vesículas constituídas por PC, PE, colesterol (cho) y esfingomieline (SM), hay una coexistencia de dominios  $L_d$  y dominios  $L_o$ . Este último tipo de dominio también se halla en un estado fluido, aunque el grado de ordenamiento lipídico que presenta es más elevado. El perfil de la unión de las distintas proteínas  $G\alpha_1$  a vesículas de tipo PC fue muy similar al de la unión a vesículas PC:PE:cho:SM (1:1:1:1). En ambos casos, la proteína  $G\alpha_1$  *WT Pal<sup>+</sup>* fue la que presentó mayor capacidad de unión, si bien la unión de esta proteína a vesículas de PC fue mayor que a la mezcla cuaternaria (figura 1-2-6). La ausencia de ácido palmítico en la proteína  $G\alpha_1$  hizo que la unión de la proteína a estos dos tipos de membranas modelo fuera bastante más baja, demostrando la propiedad clave del ácido palmítico para conducir la proteína  $G\alpha_1$  a este tipo de entornos lipídicos. La unión de la proteína  $G\alpha_1$  *Myr<sup>-</sup>* fue significativamente menor a la observada para cualquiera de las otras proteínas  $G\alpha_1$  recombinantes estudiadas (figura 1-2-6).



**Figura 1-2-6. Unión de la proteína  $G\alpha_i$  a membranas con propensión lamelar.** Unión de proteínas  $G\alpha_i$ , con diferente grado de acilación, a membranas con propensión lamelar de PC y PC:PE:Cho:SM (tipo “raft”). En la gráfica aparece representada la media  $\pm$  E.E.M. de 4-7 experimentos independientes. \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .

### *Efectos de los lípidos de $G\alpha_i$ en su unión a membranas biológicas.*

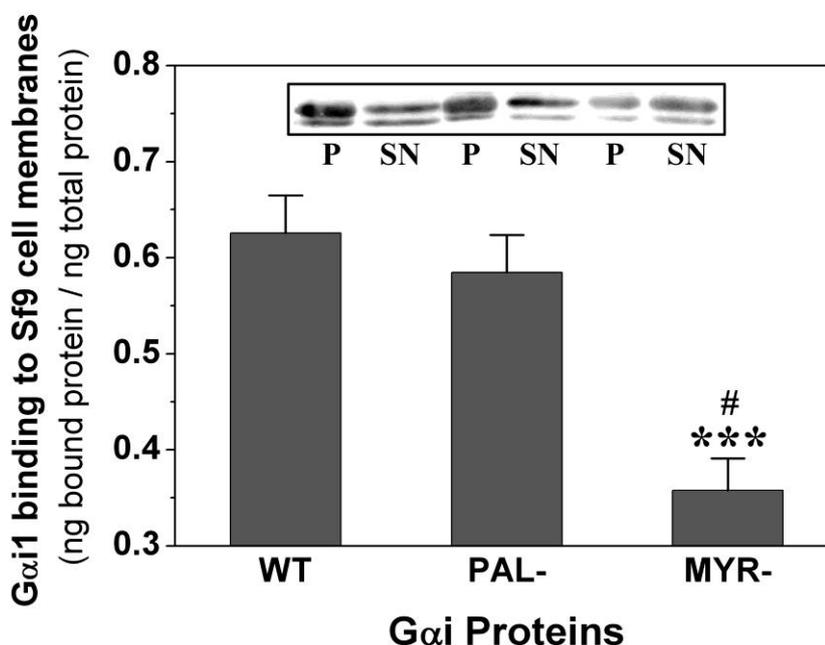
En el contexto del estudio de las interacciones lípido-proteína G, se llevó a cabo un análisis de la unión de las tres proteínas  $G\alpha_i$  recombinantes a membranas de células Sf9. La tabla 1-2-2 muestra los resultados del fraccionamiento celular aplicado a este tipo de células sobreexpresando proteína  $G\alpha_i$ , con el fin de determinar la cantidad total de cada proteína recombinante estudiada que interacciona con las membranas totales, y la cantidad que queda libre en la fracción citosólica.

Se vio que la incorporación de ácido mirístico a la proteína fue crítica en la interacción de  $G\alpha_i$  con membranas biológicas (en este caso, membranas de células Sf9), tal y como ha sido descrito en otros trabajos (Jones, T.L. et al., 1990). Así, no hubo diferencias significativas entre las proteínas  $G\alpha_i$  WT y  $G\alpha_i$  Pal<sup>-</sup> en su unión a membranas biológicas. En cambio, la ausencia de ácido mirístico en la proteína  $G\alpha_i$  provocó un descenso significativo en su interacción con membranas de células Sf9 (figura 1-2-7).

**Tabla 1-2-2. Unión de proteínas  $G\alpha_1$  WT,  $G\alpha_1$  Pal<sup>-</sup> y  $G\alpha_1$  Myr<sup>-</sup> a membranas totales de células Sf9.** Los resultados representan la cantidad total de proteína  $G\alpha_1$  recombinante ( $\mu\text{g}$  / ml lisado)  $\pm$  E.E.M. (n=3) en las fracciones de membrana y citosol.

<i>Localización en células Sf9</i>		
<i>(<math>\mu\text{g}</math> de proteína en 1 ml de lisado)</i>		
<i>Proteínas <math>G\alpha_1</math></i>	<i>Membranas</i>	<i>Citosol</i>
<i>WT</i>	$9,17 \pm 3,10$	$5,96 \pm 2,54$
<i>PAL<sup>-</sup></i>	$11,72 \pm 4,00$	$9,55 \pm 3,55$
<i>MYR<sup>-</sup></i>	$7,71 \pm 3,21$	$13,97 \pm 5,63$

Estos resultados parecen indicar que el ácido mirístico, en mayor medida, es crítico para el anclaje de la proteína  $G\alpha_1$  a membranas, mientras que el ácido palmítico influiría decisivamente en la movilización de la proteína entre diferentes microdominios de membrana (Huang et al., 1999; Bijlmakers & Marsh, 2003).



**Figura 1-2-7. Unión de proteínas  $G\alpha_1$  recombinantes a membranas de células Sf9.** La unión de cada proteína  $G\alpha_1$  recombinante a membranas totales de células Sf9 aparece representada en la figura. Se muestran “immunoblots” que reflejan la distribución de las diferentes proteínas  $G\alpha_1$  entre las fracciones de pellet (P) y sobrenadante (SN). Los resultados representados son la media  $\pm$  E.E.M. de 3 experimentos independientes, con tres réplicas por experimento. \*\*\*,  $p < 0,001$ . # indica la existencia de diferencias significativas en la unión de la proteína  $G\alpha_1$  Myr<sup>-</sup> a membranas totales, respecto a la unión de la proteína  $G\alpha_1$  Pal<sup>-</sup>.

### 1.2.3. Análisis estructural del dominio N-terminal de $G\alpha_i_1$ .

Mediante diversas herramientas informáticas de simulación se llevó a cabo un estudio estructural detallado de la región amino-terminal de la proteína de señalización  $G\alpha_i_1$ .

Dichos estudios predicen una estructura secundaria de tipo  $\alpha$ -helicoidal para la región N-terminal de las distintas proteínas  $G\alpha$  que son capaces de incorporar ácido mirístico, entre ellas la que es objeto de estudio en este trabajo (figuras 1-2-8 A y B). En un análisis más exhaustivo de esa hélice  $\alpha$  amino-terminal de la proteína  $G\alpha_i_1$ , se observó que existen en esa región una serie de aminoácidos básicos, que además se hallan altamente conservados en las restantes proteínas  $G\alpha$  miristoiladas (figura 1-2-8 B). Se trata de seis aminoácidos que se hallan localizados en el mismo lado de la hélice, constituyendo un pequeño parche de cargas positivas, tal y como se puede observar en la proyección de la hélice en el plano, mostrada en la figura 1-2-8 C (grupo de aminoácidos encerrados dentro de círculos azules). La localización de este dominio polibásico próxima a los puntos de unión de los ácidos grasos saturados de la proteína, refuerza la hipótesis a favor de un papel clave de la hélice  $\alpha$  N-terminal en la interacción con los lípidos de la membrana, en consonancia con los resultados de la unión de la proteína  $G\alpha_i_1$  a membranas modelo.

Por otro lado, se estudiaron las conformaciones más estables de los cinco primeros aminoácidos de la proteína  $G\alpha_i_1$  en función de la presencia o ausencia de los ácidos grasos que se unen al extremo amino-terminal de la proteína. Criterios de estabilidad termodinámica marcan una ordenación diferente de esos cinco aminoácidos, según que estén presentes los dos ácidos grasos, sólo el ácido mirístico, o bien, ninguno de ellos (figura 1-2-8 D). Este resultado vino a confirmar otra hipótesis fundamental en los estudios de la interacción  $G\alpha_i_1$ -membranas, como es que la presencia del ácido palmítico cambia la estructura secundaria de la región N-terminal de la proteína  $G\alpha_i_1$ . Los resultados de modelado molecular asistido por ordenador están también respaldados por los resultados de los estudios de unión de la proteína  $G\alpha_i_1$  a liposomas.



## Capítulo 2.

# MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA INTERACCIÓN DEL HETERODÍMERO $G\beta_1\gamma_2$ CON MEMBRANAS LIPÍDICAS

## 2.1. INTRODUCCIÓN

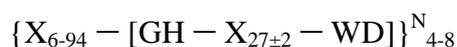
### 2.1.1. Análisis estructural del complejo $G\beta\gamma$ .

El heterodímero  $G\beta\gamma$  es un complejo de señalización que resulta de la fuerte asociación que se establece entre las proteínas  $G\beta$  y  $G\gamma$ . Tal es la fuerza de esa unión, que el complejo sólo puede disociarse bajo condiciones desnaturalizantes.

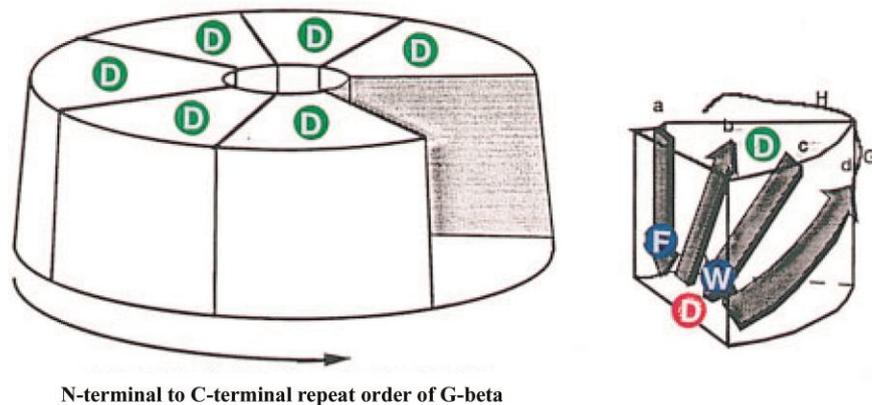
De las seis isoformas distintas pertenecientes al grupo de proteínas  $G\beta$ , las subunidades  $G\beta_{1-4}$  tienen una homología de secuencia del 78-88% (Schwindinger & Robishaw, 2001). Así, las características estructurales de la subunidad  $G\beta_1$ , expuestas en este apartado, son aplicables a las otras tres subunidades  $G\beta$ , considerando el alto grado de identidad existente entre ellas.

El núcleo estructural de la subunidad  $G\beta_1$  está constituido por un dominio  $\beta$ -helicoidal que consta de siete motivos, cada uno de los cuales es una hoja  $\beta$  de cuatro hebras antiparalelas. Las siete hojas  $\beta$  se disponen en torno a un canal central estrecho, y lo hacen de forma casi paralela al eje longitudinal del canal. Las hojas  $\beta$  se distribuyen de modo tal, que el diámetro de la hélice en el extremo de la proteína que encara la membrana es ligeramente más grande que en el otro extremo (figura 2-1-1).

Un motivo denominado *WD40* se repite siete veces en la proteína  $G\beta_1$ . En este motivo, sólo unos pocos residuos están bien conservados, y ninguno de ellos absolutamente. El motivo *WD40* de estas proteínas tiene una estructura (Neer et al, 1994):



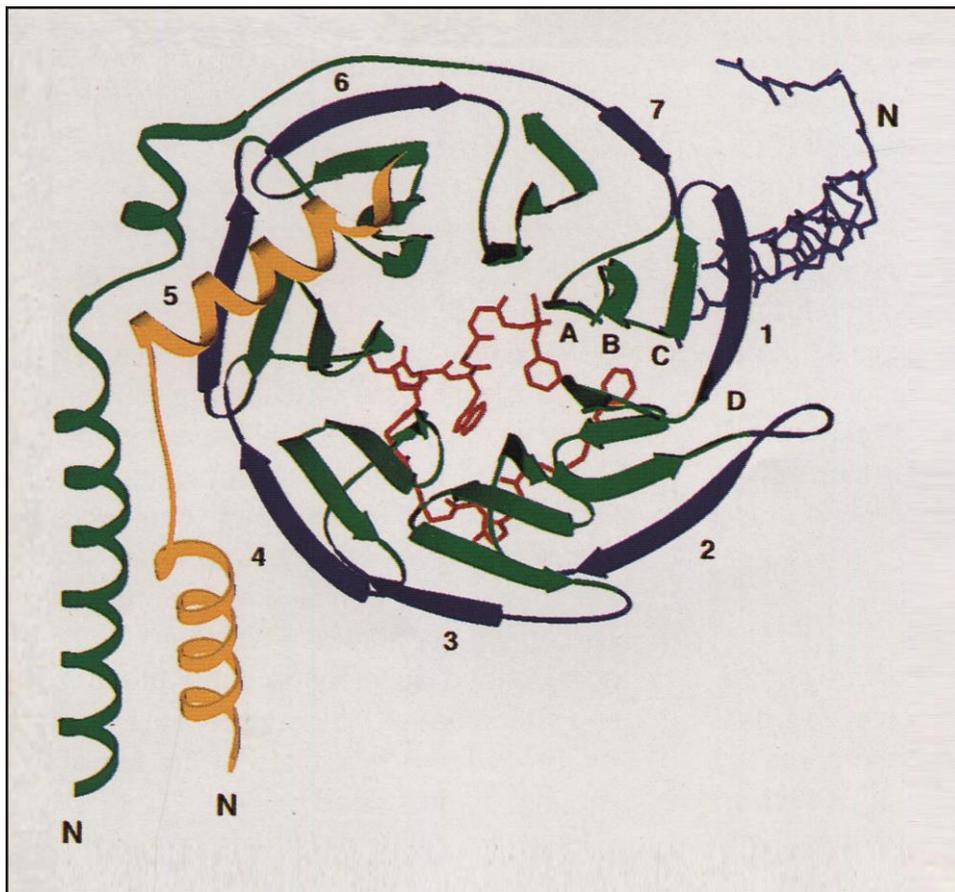
donde X es cualquier aminoácido, G es glicina, H es histidina, W es triptófano y D aspartato. Mediante la técnica de difracción de rayos X se pudo confirmar que este motivo *WD* se pliega en una estructura modular, que es capaz de ensamblarse con unidades similares para constituir un dominio  $\beta$  helicoidal con forma de barril (figura 2-1-1). La primera hebra de cada hoja  $\beta$ , denominada hebra A, se alinea con el canal interior del “barril” y, de forma serpenteante, tres hebras más progresan hacia fuera. De entre todas estas hebras, la cuarta, denominada hebra D, forma el borde exterior de la hélice. Los “loops” AB, que conectan las hebras A y B de cada hoja, y los “loops” CD, se localizan en el extremo ensanchado del “barril”, donde la subunidad  $G\gamma_2$  se halla unida por la región de las hojas 5 y 6. Por otro lado, los “loops” BC y DA se localizan en el extremo opuesto, con el que interacciona la región “switch II” de la subunidad  $G\alpha_1$  (figura 2-1-2) (Wall et al, 1995).



**Figura 2-1-1. Estructura helicoidal de la proteína  $G\beta$ .** Se muestra la disposición de las siete hojas  $\beta$  de la proteína, así como la posición relativa de las cuatro hebras  $\beta$  dentro de cada hoja  $\beta$ . Además, aparecen resaltados los aminoácidos claves del motivo *WD*. El aminoácido *Asp*, que es crítico en la constitución del motivo *WD*, se indica con un círculo rojo. Los aminoácidos aromáticos altamente conservados, localizados en los extremos inferiores de las hebras A y C, se muestran con círculos azules (figura adaptada de Neer, E.J. & Smith, T.F. (1996) *Cell*, **84**: 175-178).

En el motivo *WD40*, anteriormente representado, la porción amino-terminal variable forma el “loop” CD y gran parte de la hebra D. El resto del motivo que se repite contribuye de forma predominante a la constitución de las hebras A, B y C de cada hoja  $\beta$ .

La secuencia amino-terminal de la primera repetición *WD40* de la proteína  $G\beta_1$  es incorporada como la hebra D de la última hoja  $\beta$ , mientras que la secuencia carboxi-terminal de la proteína da lugar a las hebras A, B y C de esta última hoja. Así, la primera y la última hebras de todas las que constituyen las distintas hojas  $\beta$  son adyacentes en la última hoja  $\beta$ , circularizando la estructura (figura 2-1-2) (Wall et al, 1995).



**Figura 2-1-2. Imagen estructural del heterodímero  $G\beta_1\gamma_2$ .** La mayor parte de la proteína  $G\beta$  aparece coloreada de verde, exceptuando las regiones de la proteína que conectan los motivos *WD40*, que han sido coloreadas de azul. La hebra D de cada hoja  $\beta$  forma parte de estas regiones pintadas de azul. La proteína  $G\gamma$  está enteramente coloreada de amarillo. La región *switch II* de  $G\alpha_i$  y los 34 aminoácidos del extremo amino-terminal de esta proteína aparecen también representados (figura adaptada de Wall M.A. et al. (1995) *Cell* **83**: 1047-1058).

Entre los rasgos estructurales más notables que implican a los residuos más conservados de las repeticiones *WD40*, está la tétada que comprende los residuos Trp-30, Thr/Ser-20, His-2 y Asp-24, unidos mediante puentes de hidrógeno. El aspártico en posición 24 es un residuo que se repite en cada una de las hojas  $\beta$  de la proteína  $G\beta_1$ . El residuo siguiente, en la posición 25, promueve la aparición de una estructura de tipo

helicoidal en esa región de la proteína, lo que permite a su vez que el aspártico invariable se proyecte hacia el interior de una horquilla de cinco aminoácidos, que conecta las hebras B y C de cada hoja (Wall et al, 1995).

Los primeros 47 aminoácidos de la subunidad  $\beta_1$  forman una cadena polipeptídica que envuelve parcialmente el extremo de mayor tamaño del dominio  $\beta$ -helicoidal. Esta cadena amino-terminal consta de dos hélices  $\alpha$ : una que abarca los 27 primeros aminoácidos de la proteína, y otra más corta que termina en el aminoácido 36. Los residuos del 38 al 47 adoptan una conformación extendida e irregular (figura 2-1-2). La dirección de la cadena polipeptídica de la proteína  $G\gamma_2$  es paralela a la del extremo amino-terminal de  $G\beta_1$ . Los residuos amino-terminales, que van de la posición 10 a la 25 en la proteína  $G\gamma_2$ , tienen una estructura de hélice  $\alpha$  y se empaquetan contra la hélice amino-terminal de la subunidad  $G\beta_1$ . Ambas hélices se cruzan formando un ángulo de aproximadamente  $15^\circ$ , lo que sugiere una interacción hélice-hélice casi paralela. Ambas hélices divergen hacia su extremo amino. Por su parte, una segunda hélice  $\alpha$  de la proteína  $G\gamma_2$ , que va del residuo 29 al 44, contacta a través de puentes de hidrógeno con el segmento intrahelicoidal irregular de  $G\beta_1$ . Esta segunda hélice discurre por una cavidad hidrofóbica acondicionada por “loops” de la hoja  $\beta$  número 6. La región de contacto de las hojas 5 y 6 de  $G\beta_1$  con la segunda hélice  $\alpha$  de  $G\gamma_2$  parece determinar la selectividad de las proteínas  $G\gamma$  por las diferentes proteínas  $G\beta$  (Wall et al, 1995, Vögler et al, 2004; Barceló et al, 2007).

La información que se tiene acerca de la organización estructural del extremo carboxilo de la proteína  $G\gamma$  es más escasa. Como ya se ha indicado, en esta región ocurre la incorporación de un lípido isoprenoide, ya sea un resto farnesilo o bien un resto geranilgeraniol, lo que complica enormemente la cristalización de la proteína para su estudio por difracción de rayos X. No obstante, los resultados de estos y otros estudios apuntan a que esta región de la proteína  $G\gamma$  participa decisivamente en el anclaje a la membrana tanto del dímero  $G\beta\gamma$  como del complejo trimérico  $G\alpha\beta\gamma$  (Wall et al, 1995).

No hay evidencias acerca de la existencia de un patrón de ordenamiento concreto de la región carboxi-terminal de la proteína  $G\gamma$  formando parte del complejo heterodimérico. Sin embargo, esto podría depender del ambiente que envuelve esa parte de la proteína. En este sentido, conviene destacar una propiedad intrínseca a todas las proteínas y, especialmente, a todas aquellas que interactúan con lípidos: se trata de su *plasticidad estructural*, es decir, su capacidad para reorganizarse estructuralmente dependiendo del

tipo de moléculas con las que estén interactuando en un momento dado. En este trabajo, abordamos en detalle esta cuestión relevante desde el punto de vista de las interacciones lípido-proteína G. Un estudio de las modificaciones estructurales que ocurren en las proteínas resulta necesario en el marco de la señalización celular, y especialmente en el caso de las proteínas G, teniendo en cuenta su gran movilidad dentro de la célula, sus diferentes estados de actividad y su relevancia funcional (Wall et al, 1995; Schwindinger & Robishaw, 2001; Dupré et al, 2009).

### **2.1.2. Diversidad de las proteínas G $\beta$ y G $\gamma$ : la señalización celular en clave evolutiva.**

Una característica que revela el importante papel funcional que juega el heterodímero G $\beta\gamma$  en las células es su heterogeneidad, plasmada en la diversidad de proteínas G $\beta$  y G $\gamma$  conocidas: 6 proteínas G $\beta$  y 12 proteínas G $\gamma$  diferentes han sido identificadas en el ser humano. Esta heterogeneidad se traduce en expresión de diferentes heterodímeros según el tejido. Así, la proteína G $\beta_5$  se expresa sólo en el sistema nervioso central (SNC), y una variante más larga de esta proteína, en la retina. Estas dos proteínas muestran mucha menos homología con las proteínas G $\beta_{1-4}$ , que éstas últimas entre ellas.

En el caso de las proteínas G $\gamma$ , la diversidad es aún mayor. Se han agrupado en subfamilias, según el grado de homología existente, sobre todo, en la región carboxi-terminal. Como ya se ha comentado anteriormente, esta región es muy importante, por tratarse de la parte de la proteína de más estrecho contacto con las membranas biológicas y con componentes proteicos de las mismas (Gautam et al, 1998). Es precisamente el aminoácido carboxi-terminal de la proteína G $\gamma$  recién sintetizada el que determina el tipo de isoprenilación que tendrá lugar en dicha proteína. Así, las proteínas G $\gamma$  que terminan en serina, como son G $\gamma_1$ , G $\gamma_9$  y G $\gamma_{11}$ , incorporan un resto farnesilo en la cisteína más próxima al extremo carboxilo. El resto de proteínas G $\gamma$ , que terminan en leucina, incorporan un resto geranylgeraniol más largo (tabla 2-1-1; Escrivá et al, 2007).

La incorporación a la proteína G $\gamma$  de uno u otro lípido isoprenoide tiene gran relevancia funcional y guarda relación con la localización específica de estas proteínas, en lo que respecta al patrón de expresión específico de cada proteína G $\gamma$  dentro de un organismo y, también, a su distribución dentro de las células. Así, las proteínas G $\gamma_1$  y G $\gamma_9$  se localizan en la retina: G $\gamma_1$  en los bastones y G $\gamma_9$  en los conos (Gautam et al, 1998;

Downes & Gautam, 1999). Junto a ellas se expresan específicamente, en la retina, las proteínas  $G\alpha_1$  en combinación con  $G\gamma_1$ , y  $G\alpha_2$  en combinación con  $G\gamma_9$  (Downes & Gautam, 1999).

Otro agrupamiento que se hace dentro de la familia de proteínas  $G\gamma$  es el de las proteínas  $G\gamma_2$ ,  $G\gamma_3$  y  $G\gamma_4$ , todas ellas abundantemente expresadas en el sistema nervioso, aunque la proteína  $G\gamma_2$  se localiza también en otros tejidos (Gautam et al, 1998).

En relación con la distribución celular diferencial de proteínas  $G\gamma$  que están formando parte del complejo  $G\beta\gamma$ , la región carboxi-terminal de las proteínas  $G\gamma$  resulta, una vez más, determinante. Se ha visto que está implicada en los procesos de translocación de complejos  $G\beta\gamma$  de la membrana plasmática a sistemas de membranas intracelulares. Las implicaciones funcionales de este fenómeno son muy notables, pues supone el traslado de componentes activos de los sistemas de transducción de señal, en los que están implicados RAPG, a otras membranas distintas de la membrana plasmática (Saini et al, 2007). De esta manera, la activación de un receptor en la superficie de la célula podría llevar a una rápida propagación de la señal hacia el sistema de endomembranas, donde podrían activarse vías de señalización claves. Una de estas vías es la vía PI3K/PKB, dependiente de  $G\beta_{1\gamma_2}$ , que se ha demostrado que se activa en endosomas tempranos, en respuesta a la estimulación de receptores de LPA (García-Regalado et al, 2008).

La propiedad de los complejos  $G\beta\gamma$  para translocarse de unas membranas a otras depende de las secuencias de aminoácidos de las proteínas  $G\gamma$ . Así, se trata de procesos de translocación diferenciales desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo (Saini et al, 2007). En un estudio pionero, de las 12 proteínas  $G\gamma$  conocidas, 6 de ellas, inicialmente localizadas en la membrana plasmática, sufren translocación a membranas intracelulares tras la activación de un receptor muscarínico. Las proteínas  $G\gamma_1$ ,  $G\gamma_9$  y  $G\gamma_{11}$ , todas ellas portadoras de un resto farnesilo, se translocan a las membranas del aparato de Golgi, al igual que las proteínas  $G\gamma_5$  y  $G\gamma_{10}$ , portadoras, en este caso, de un resto geranilgeraniol. La proteína  $G\gamma_{13}$ , que también lleva unido el lípido geranilgeraniol, se mueve en cambio al retículo endoplasmático (RE). El resto de proteínas  $G\gamma$  no experimentan translocación alguna.

Las subunidades  $\gamma$  que sufren translocación tras activación de un receptor, muestran en su secuencia una relación más estrecha entre ellas que la que existe con las que no sufren translocación (Saini et al, 2007). Entre las proteínas  $G\gamma$  translocadas, hay diferencias que se correlacionan estrechamente con el grado de homología entre sus secuencias. Así, las proteínas  $G\gamma$  farnesiladas,  $G\gamma_1$ ,  $G\gamma_9$  y  $G\gamma_{11}$ , se translocan más

rápida­mente que las proteínas  $G_{\gamma 5}$  y  $G_{\gamma 10}$ , englobadas dentro de otra subfamilia de proteínas  $G_{\gamma}$  (Saini et al, 2007). En cambio, las proteínas  $G_{\gamma}$  que quedan retenidas en la membrana plasmática, muestran una notable conservación de los aminoácidos de la región carboxi-terminal, especialmente de los aminoácidos básicos cercanos al grupo geranilgeraniol. El pequeño dominio polibásico de la región C-terminal de  $G_{\gamma 2}$  es objeto de profundo análisis en este capítulo, a la vista de su posible relevancia estructural y funcional.

Desde una perspectiva evolutiva, existe en mamíferos una expansión de subfamilias de proteínas implicadas en la señalización celular, que está altamente correlacionada con la creciente complejidad de la organización celular de estos organismos. Algunos autores han sugerido que los patrones de diversidad correspondientes a las distintas subunidades de proteínas G, y a receptores acoplados a ellas, constituyen la respuesta a una necesidad creciente que tiene un organismo con una arquitectura cada vez más compleja. Se trataría de una estrategia que le permitiría diversificar los procesos de señalización celular que en él han de darse, para llegar a alcanzar un grado de funcionalidad completa (Downes & Gautam, 1999).

Mientras que en mamíferos existen 5 genes para la subunidad  $\beta$  de la proteína G agrupados en dos clases, en la levadura, un organismo unicelular, sólo hay un gen denominado *STE4*. En cambio, en un organismo pluricelular, como el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, existen dos genes distintos para dicha subunidad, que se corresponden con las dos subfamilias existentes en mamíferos (Downes & Gautam, 1999). En el caso de la subunidad  $\gamma$ , las distintas proteínas  $G_{\gamma}$  de mamíferos se agrupan en cuatro subfamilias, mientras que la levadura tiene un único gen para dicha subunidad, denominado *STE18*, cuyo producto presenta muy poca homología con las subunidades  $\gamma$  de mamíferos. Tampoco en *C. elegans* los dos genes correspondientes a la subunidad  $G_{\gamma}$  guardan demasiada relación con alguna de las subfamilias de proteínas  $G_{\gamma}$  de mamíferos (Gautam et al, 1998; Downes & Gautam, 1999). Igual que existe un incremento en la diversidad de las distintas subunidades de las que constan las proteínas G, también se ha observado un incremento en la variedad de genes que codifican RAPGs (Downes & Gautam, 1999).

Otras características de los sistemas de transducción de señal en los que participan proteínas G pueden inferirse a partir de un enfoque de tipo evolutivo que contemple la diversidad de subunidades de proteínas G existente. Así, en mamíferos se ha visto que los genes de las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  de la proteína G son mucho más diversos que los

genes correspondientes a la subunidad  $\beta$ . Esto puede ser un reflejo de una mayor diversidad funcional o de una mayor relevancia de las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  respecto a la  $\beta$  (Downes & Gautam, 1999). No en vano, son las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  las que contactan específicamente con los receptores. Así pues, una importante diversidad de estas proteínas sería necesaria para que existiera un acoplamiento específico receptor-proteína G, si se tiene en cuenta la notable diversidad de receptores existente. En este sentido, una amplia diversidad de proteínas  $G\alpha$  permitiría también aumentar la especificidad de la interacción de dichas proteínas con las numerosas proteínas efectoras que se sabe que existen (Downes & Gautam, 1999). Tal diversidad podría obedecer, también, a una situación contraria. Varias subunidades distintas que interaccionen con el mismo receptor podrían permitir que una ruta de señalización clave no se viera interrumpida debido a la existencia de una subunidad de proteína G defectuosa (Downes & Gautam, 1999). Se trataría de dos mecanismos distintos que permitirían dar una solución completa al problema del aumento en complejidad de los organismos vivos.

### **2.1.3. Papeles del heterodímero $G\beta\gamma$ en la señalización celular.**

Hasta no hace mucho, se creía que el papel primordial y casi exclusivo del dímero  $G\beta\gamma$  consistía en regular la acción de la enzima  $G\alpha$  en el ciclo de activación / desactivación de dicha proteína (Gautam et al, 1998). Mediante su interacción con la proteína  $G\alpha$ , actuaría como un inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina, constituyendo un complejo heterotrimérico inactivo unido a GDP, estabilizando la unión del nucleótido GDP al complejo de señalización, e impidiendo su sustitución por GTP (Dupré et al, 2009). En cambio, un receptor que fuera capaz de interaccionar con el complejo inactivo, se comportaría, tras su activación, como lo haría un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, “guanine nucleotide exchanging factor”), es decir, promoviendo la liberación del nucleótido GDP de la proteína  $G\alpha$ , y su sustitución por GTP (Dupré et al, 2009).

En 1987 se puso de manifiesto por primera vez la participación directa del dímero  $G\beta\gamma$  en los procesos de señalización celular, cuando se comprobó que, por sí sólo, era capaz de activar un canal de potasio cardiaco, que es controlado por un receptor colinérgico muscarínico en respuesta a la acetilcolina (Logothetis et al, 1987). Hoy día son muchas las pruebas de su implicación como modulador de proteínas efectoras en numerosas

rutas de señalización. Así, el heterodímero  $G\beta\gamma$  es capaz, al igual que la proteína  $G\alpha$ , de regular positiva o negativamente proteínas clave como la fosfolipasa C (PLC), la adenilil ciclasa, canales de potasio, canales de calcio dependientes de voltaje y un canal de sodio del cerebro (Gautam et al, 1998; Schwindinger & Robishaw, 2001). Más aún, la relevancia funcional del complejo  $G\beta\gamma$  adquiere una nueva dimensión, al constatar su papel como componente central en las vías de señalización celular que regulan la proliferación y supervivencia celulares (Schwindinger & Robishaw, 2001).

Además, se ha comprobado también que el complejo  $G\beta\gamma$  es absolutamente imprescindible para la interacción de las proteínas G con los receptores a los que se acopla y, en consecuencia, para la activación del complejo por dichos receptores. Estudios llevados a cabo con la transducina y la rodopsina pusieron de manifiesto la existencia de una interacción directa complejo  $G\beta\gamma$ -receptor. En el caso concreto del sistema de transducción de la señal visual, la interacción de  $G\beta_1\gamma_1$  con la rodopsina es a través de la cola carboxi-terminal del receptor (Gautam et al, 1998). Se vio, también, que el acoplamiento de la transducina a dicho receptor era dependiente del tipo de subunidad  $\gamma$  que formaba parte del complejo, lo que ponía de manifiesto la participación directa de las subunidades  $\gamma$  de las proteínas G en la interacción específica receptor-proteína G (Kisselev & Gautam, 1993). Más tarde, se determinaron con mayor exactitud las partes de la proteína  $G\gamma_1$  que participaban en la unión a la rodopsina: se trataba de los residuos de la región carboxi-terminal *Phe-64* y *Leu-67*, y del grupo farnesilo (Kisselev et al, 1995).

Si en el caso de la interacción con el receptor, la subunidad  $\gamma$  del complejo heterodimérico es la que juega un papel primordial; en el caso de la interacción con las proteínas efectoras de los sistemas de transducción de señal, es la proteína  $G\beta$  la que ocupa un lugar destacado. Un dominio amino-terminal de 100 residuos en la proteína  $G\beta$ , próximo a la hélice  $\alpha$  implicada en la interacción con  $G\gamma$ , participa en la interacción directa con las proteínas calmodulina, adenilil ciclasa, PLC y canal de potasio cardiaco. Tal dominio se halla situado en la primera y segunda hojas  $\beta$  de la proteína  $G\beta$  (Yan & Gautam, 1997; Gautam et al, 1998). No obstante, también la proteína  $G\gamma$  está implicada en la interacción del heterodímero con proteínas efectoras, como se ha demostrado en el caso del canal de potasio cardiaco *GIRK* (Peng et al, 2003).

Un motivo QXXER presente en las proteínas adenilil ciclasa de tipo II, *GIRK1*,  *$\beta$ ARK* y canales de  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$ , parece estar implicado en las interacciones directas de estas proteínas con el heterodímero  $G\beta\gamma$  (Gautam et al, 1998).

Como ya se indicara anteriormente, un hecho relevante acerca del papel central que juega el complejo  $G\beta\gamma$  en la señalización celular ha sido la demostración de su participación directa en las principales rutas celulares que controlan la proliferación y la supervivencia celulares. Dímeros  $G\beta\gamma$  estimulan la proliferación celular a través de la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (*MAPK*), y promueven la supervivencia celular mediante la activación del enzima PI3K (Schwindinger & Robishaw, 2001). Finalmente,  $G\beta\gamma$  dirige la aproximación de  $G\alpha$  a receptores (Vögler et al, 2004).

#### **2.1.4. Implicación del dímero $G\beta\gamma$ en los procesos de crecimiento y diferenciación celulares.**

Existen varias rutas de activación de la vía *MAPK* dependiente de RAPG. La primera ruta en la que se observó que el dímero  $G\beta\gamma$  estaba implicado, era aquella que conducía a la activación de proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (*ERK1*, *ERK2*). También se ha visto que dímeros  $G\beta\gamma$  son capaces de acoplar RAPG a la estimulación de *JNK* y *p38 MAPK*, proteínas quinasas características de otras rutas *MAPK* (Schwindinger & Robishaw, 2001).

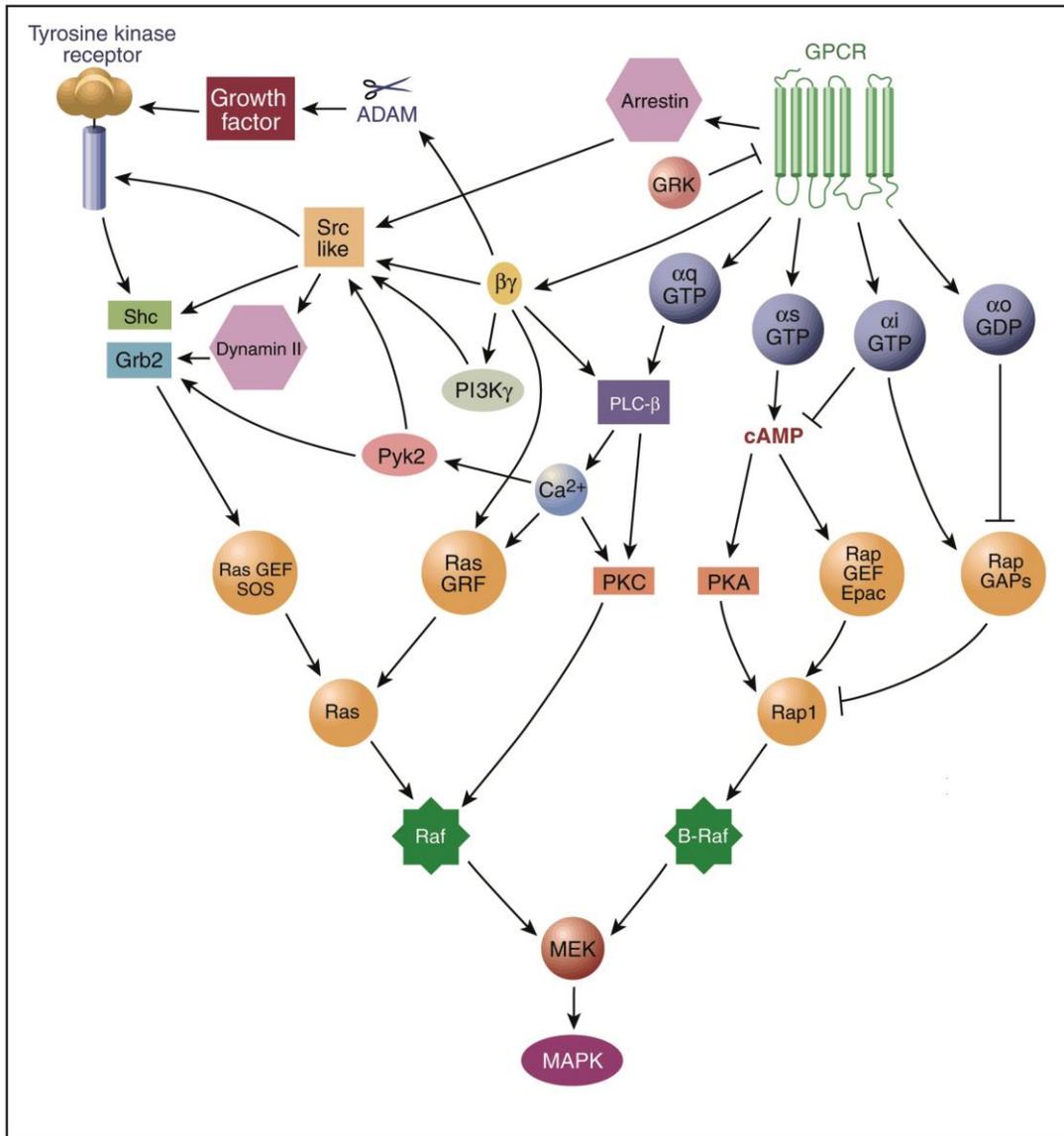
Existen varios posibles efectores que constituirían el primer paso en la activación de la vía *MAPK* por dímeros  $G\beta\gamma$  (figura 2-1-3). A través de PI3K, los dímeros  $G\beta\gamma$  podrían incrementar la actividad de proteínas tirosina quinasa de la familia *Src*, activando así la ruta *MAPK*. Otra forma sería a través de la acción directa del heterodímero sobre las propias proteínas tirosina quinasa sin actividad receptora. Un efector intracelular que también puede estar implicado es la  $PLC\beta$ , sobre el cual actuaría el dímero  $G\beta\gamma$ , teniendo lugar la activación de la ruta *MAPK*, de modo similar a como lo hace la proteína  $G\alpha_q$  (Schwindinger & Robishaw, 2001).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la interrelación de rutas dependientes de dímeros  $G\beta\gamma$  y de aquéllas que dependen de proteínas tirosina quinasa con función de receptor. Se ha visto que ambas rutas convergen en la activación de una proteína G pequeña: la proteína Ras. Además, diversos componentes de la vía dependiente de receptores con actividad tirosina quinasa son activados por el dímero  $G\beta\gamma$  (Gutkind, 2000). En consecuencia, parece existir una interconexión entre ambas rutas, que lleva a

la activación de la vía *MAPK* (figura 2-1-3). En este sentido, el dímero  $G\beta\gamma$  parece desempeñar un papel central como activador de estas dos vías de señalización cruciales para el control de la proliferación celular (Schwindinger & Robishaw, 2001).

También el complejo  $G\beta\gamma$  resulta ser clave en los procesos de señalización dependientes de proteínas G que están implicados en la supervivencia celular. Así, el dímero  $G\beta\gamma$  es capaz de activar el enzima PI3K de la clase IB (Stephens et al, 1997). PI3K es un componente central de las rutas de transducción de señal activadas por distintos receptores de supervivencia (receptores con actividad tirosina quinasa, RAPG y receptores acoplados a proteínas tirosina quinasa sin actividad receptora). La activación de PI3K conduce a la producción de un segundo mensajero intracelular, el fosfatidilinositol-3',4',5'-trifosfato ( $PIP_3$ ), lo que a su vez lleva a la activación de PKB, también conocida como *c-AKT*. PKB es una proteína que promueve la supervivencia, actuando en múltiples puntos: inactivando componentes de la maquinaria apoptótica, inhibiendo la expresión de genes de muerte e induciendo la expresión de genes de supervivencia (Schwindinger & Robishaw, 2001).

Los dímeros  $G\beta\gamma$  activan directamente  $PI3K\gamma$  y, tanto los dímeros  $G\beta\gamma$  como los péptidos Py, actúan de un modo sinérgico activando el enzima  $PI3K\beta$ , ésta última con una distribución más amplia que  $PI3K\gamma$  (Schwindinger & Robishaw, 2001).



**Figura 2-1-3. Múltiples rutas que conectan RAPG con MAPKs.** El dímero  $G\beta\gamma$  juega un papel clave en la activación de la vía MAPK, actuando sobre diversos efectores (ver texto para descripción más detallada). Las flechas indican estimulación positiva, mientras que las líneas truncadas indican inhibición (figura adaptada de Gutkind, J.S. (2000) *Sci STKE*, **40**: 1-14).

Una propiedad relevante observada en estas rutas de señalización es la capacidad que presenta el complejo  $G\beta\gamma$  para translocarse hacia sistemas de endomembranas, induciendo la activación de la vía PI3K – AKT en otras regiones de la célula distintas de la membrana plasmática (García-Regalado et al, 2008). Así, la transducción de la señal adquiere, bajo esta perspectiva, una nueva dimensión: la posibilidad de propagar la señal a través de la membrana plasmática hacia otras membranas de la célula, lejos del lugar donde dio comienzo el proceso de transducción con la activación del RAPG (Saini et al, 2007).

## 2.2. RESULTADOS

El objetivo general de esta parte del trabajo consistió en determinar el papel que juega la región carboxi-terminal de la proteína  $G\gamma_2$  en la interacción del heterodímero  $G\beta_1\gamma_2$  con membranas lipídicas. Dentro de esta región C-terminal de la proteína, se estudió más concretamente la parte que incorpora el lípido isoprenoide geranilgeraniol y una región adyacente que también parece estar implicada en la interacción con membranas biológicas, constituida por tres residuos con carga positiva (dominio polibásico). Asimismo, como en el capítulo 1, se trató de determinar el efecto que tienen en esa interacción diferentes tipos de lípidos. Para ello se prepararon membranas modelo (liposomas) cuya composición lipídica simula diferentes regiones o microdominios de membrana, y se produjeron y purificaron dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  nativos y mutados en puntos clave de la subunidad gamma.

### Homología entre secuencias de las distintas subunidades gamma de la proteína G

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

                                     62 64 65 68
---MPVINIEDLTEKDCLKMEVDQLKKEVTLERMLVSKCCEEVRDYVEERSGEDPLVKGI PEDKNPFKELKGGCVIS (Gγ1)
---MASN-NTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSKAADLMAYCEAHAKEDPLLTPVPAENPFREKKFFCALL (Gγ2)
MKGETPVN-STMSIGQARKMVEQLKIEASLCRIKVSKAADLMTYCDAHACEDPLITPVPTSENPFREKKFFCALL (Gγ3)
KEGMSNN-STTSISQARKAVEQLKMEACMDRVKVSQAAADLLAYCEAHVREDPLIIPVPAENPFREKKFFCTIL (Gγ4)
----MS----GSSSVAAMKVVQQLRLEAGLNRVKVSQAAADLKQFCLQNAQHDP LLTGVSSTNPFEPQKV-CSFL (Gγ5)
----MS----ATNNIAQARKLVEQLRIEAGIERIKVSKAADLMSYCEQHARNDP LLVGVPAENPFKDKKP-CIIL (Gγ7)
----MS-N-NMAKIAEARKTVEQLKLEVNIDRMKVSQAAAE LLAFCETHAKDDPLVTPVPAENPFDRKRLFVLL (Gγ8)
-----MAQDLSEKDLLKMEVEQLKKEVKNTRIPI SKAGKEIKEYVEAQAGNDPFLKGI PEDKNPFKE-KGGCLIS (Gγ9)
----MS----SGASASALQRLVEQLKLEAGVERIKVSQAAAE LQQYCMQNAACKDALLVGVPAENPFREPRS-CALL (Gγ10)
---MPALHIEDLPEKEKLMKMEVEQLRKEVKLQRQQVSKCSEEIKNYIEERSGEDPLVKGI PEDKNPFKE-KGSCVIS (Gγ11)
----MSSKTASTNNIAQARRTVQQLRLEASIERIKVSKASADLMSYCEEHARSDDLIGI PTSENPFKDKKT-CIIL (Gγ12)
-----MEEWDVPQMKKEVESLKYQLAFQREMASKTIPELLKWIEDGIPKDPFLNPDLMKNNPWE-KGRCTIL (Gγ13)
      .      :  *.:*.: :   *   *:   ::   :      *.: :      **:   :   * :

```

#### Consensus key

- \* - single, fully conserved residue
- : - conservation of strong groups
- . - conservation of weak groups
- no consensus

**Figura 2-2-1. Alineamiento de secuencias completas correspondientes a las distintas proteínas  $G\gamma$  humanas.** Los aminoácidos de interés aparecen encerrados dentro de áreas sombreadas y su posición en la secuencia de la proteína  $G\gamma_2$  se indica con el número correspondiente a dicha posición, en la parte superior del alineamiento.

El grupo lipídico geranilgeraniol se halla unido a la cisteína en posición 68 a través de un enlace tioéter, y está situado muy próximo a los tres aminoácidos básicos arriba mencionados. Éstos se localizan en las posiciones 62, 64 y 65 de la proteína y, como se

puede observar en el mapa de alineamiento mostrado en la figura 2-2-1, se trata de aminoácidos muy conservados en todas las proteínas  $G\gamma$  humanas conocidas, lo cual estaría indicando que cumplen con un importante papel funcional y/o estructural.

### 2.2.1. Expresión, purificación y caracterización lipídica de complejos diméricos $G\beta_1\gamma_2$ .

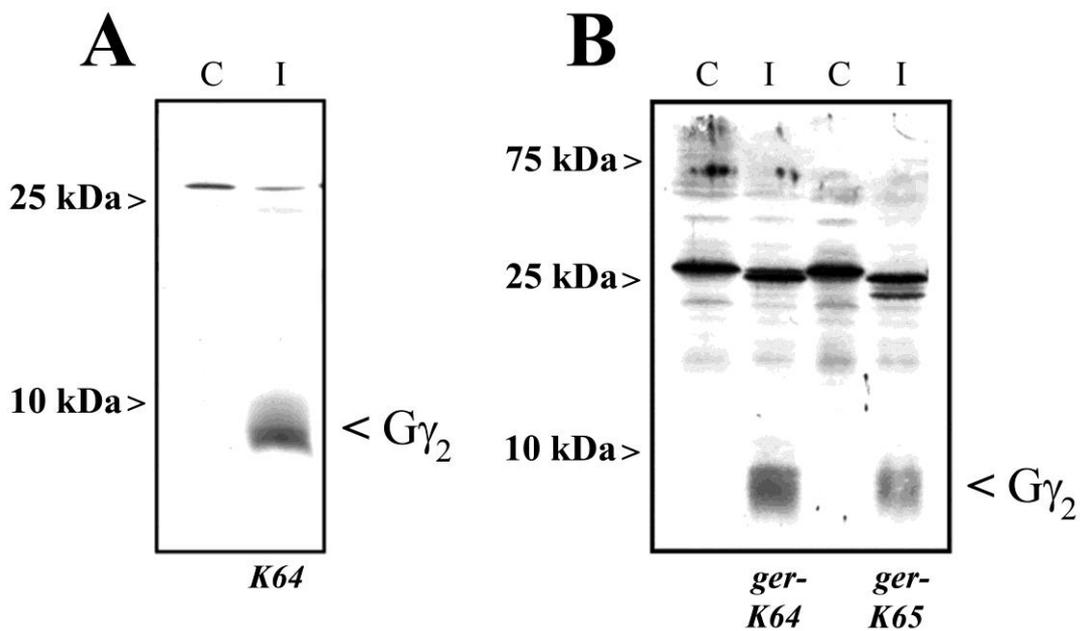
Para llevar a cabo este estudio se realizaron construcciones con la proteína  $G\gamma_2$  nativa (“wild type”), y mutantes puntuales en las bases correspondientes a los tres aminoácidos básicos de la región carboxi-terminal de la proteína y la cisteína en posición 68.



Figura 2-2-2. Secuencia de aminoácidos de la región C-terminal de la proteína  $G\gamma_2$  nativa y los distintos mutantes generados. Los aminoácidos mutados de la región C-terminal de  $G\gamma_2$  aparecen en cursiva. En azul, los aminoácidos no mutados objeto de estudio y en rojo, el resto de aminoácidos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$ .

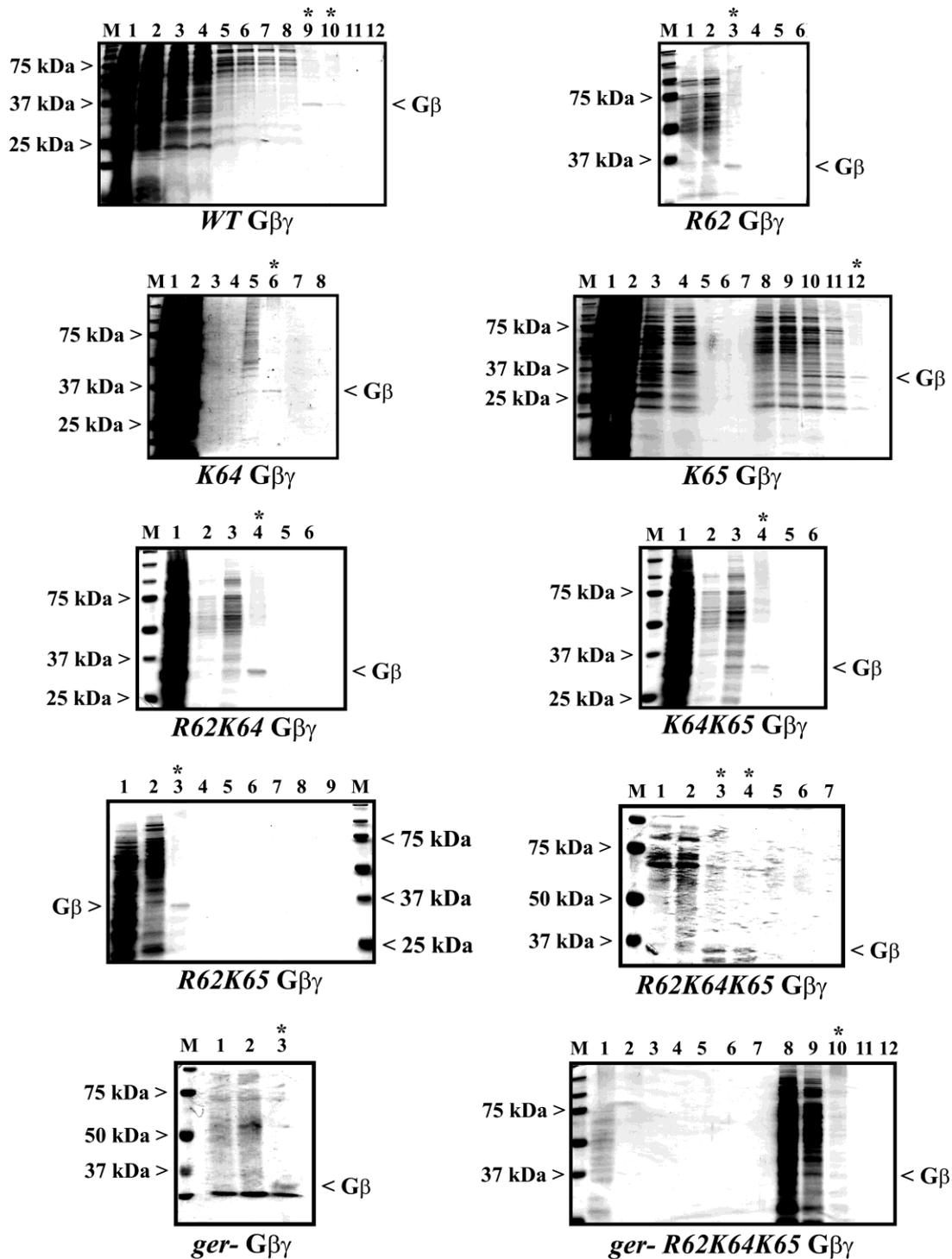
La arginina en posición 62 cambió a glicina (*R62G*), la lisina en posición 64 a glicina (*K64G*), la lisina en posición 65 a glicina (*K65G*) y, por último, la cisteína en posición 68 a serina (*C68S*). Todas las combinaciones posibles de estas distintas mutaciones aparecen representadas en la figura 2-2-2. El resultado fueron 16 secuencias distintas de ADNc correspondientes al gen de la proteína  $G\gamma_2$  humana, introducidas en un vector de expresión de proteína recombinante denominado bÁcrido, derivado del genoma del baculovirus *AcNPV*.

Las distintas proteínas  $G\gamma_2$  humanas recombinantes se expresaron en células Sf9, dando lugar a una banda marcada de aproximadamente 10 kDa, tal y como se muestra en la figura 2-2-3.



**Figura 2-2-3.** A, análisis por “western-blot” de la expresión de la proteína  $G\gamma_2$  con la mutación *K64G*. Se muestra el perfil de expresión de la proteína  $G\gamma_2$  en células Sf9 no infectadas (control, C), e infectadas (I). B, ídem en el caso de las proteínas  $G\gamma_2$  con las dobles mutaciones *ger- K64G* y *ger- K65G*.

Cada una de las proteínas  $G\gamma_2$  recombinantes se coexpresó en células Sf9 con la proteína  $G\beta_1$  humana. Los complejos diméricos resultantes se purificarón mediante cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA.



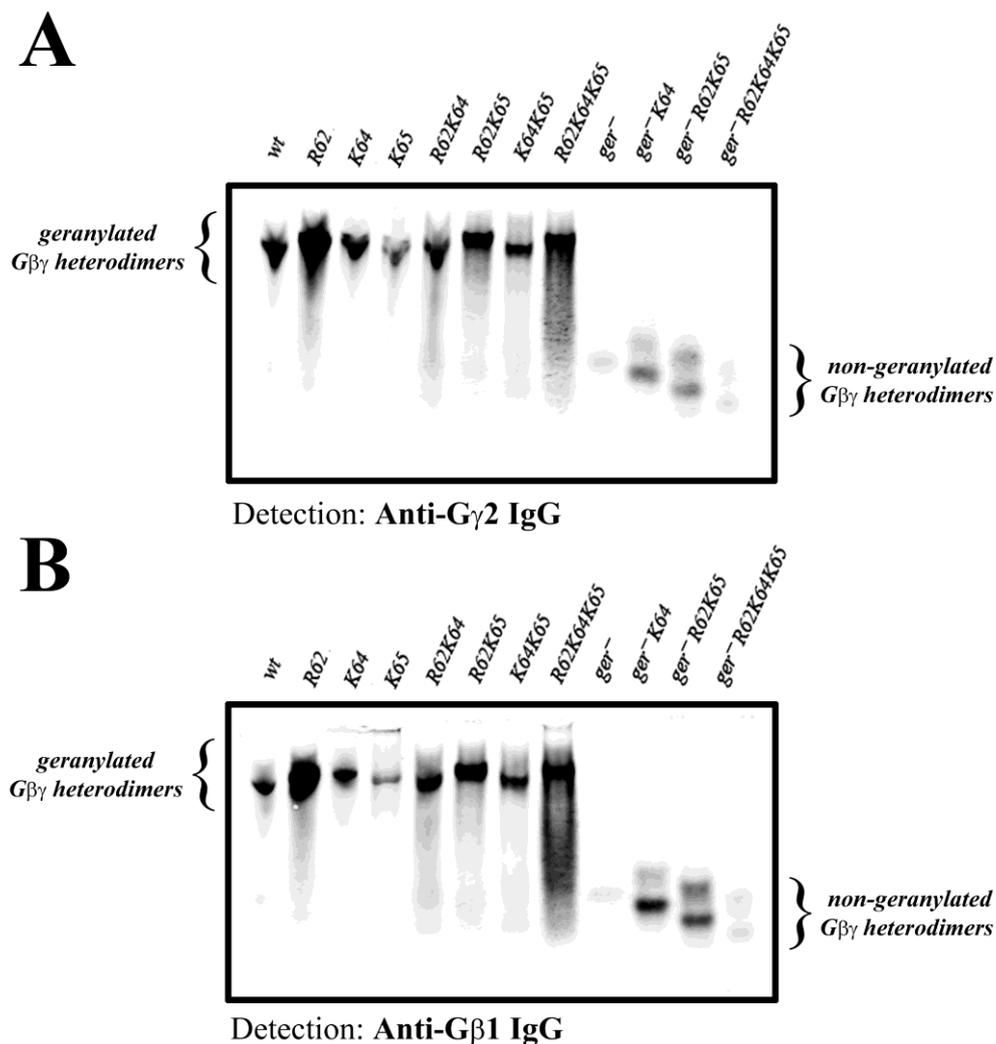
**Figura 2-2-4. Purificación de los dímeros  $G\beta\gamma$  recombinantes.** Se analizaron por *SDS-PAGE* (10% acrilamida) distintas fracciones resultantes de la cromatografía líquida (ver protocolo en “Materiales y métodos”). Aquellas fracciones más altamente enriquecidas en la proteína  $G\beta$  recombinante del heterodímero  $G\beta\gamma$  aparecen señaladas con asterisco en los geles teñidos con azul de Coomassie.

En los geles teñidos con tinte de Coomassie de la figura 2-2-4, se puede observar la proteína  $G\beta_1$  de diferentes dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  purificados, presente en las primeras fracciones de elución que resultan de la activación de la columna cromatográfica con un

tampón rico en  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $F^-$  (para más detalle sobre la purificación de los dímeros  $G\beta_1\gamma_2$ , ver sección 6.2.5.2 “Purificación de los heterodímeros  $G\beta_1\gamma_2$ ”, dentro del capítulo 6 “Materiales y Métodos”). Los diferentes complejos diméricos purificados se emplearon en estudios de unión a diversas membranas modelo.

Además de los heterodímeros  $G\beta_1\gamma_2$  de la figura 2-2-4, dos heterodímeros más no geranilgeranilados,  $G\beta_1\gamma_2\ ger^- K64$  y  $G\beta_1\gamma_2\ ger^- R62K65$ , se incorporaron a los estudios de unión entre dímeros  $G\beta\gamma$  y membranas modelo.

Por otro lado, se llevó a cabo un “western-blot” no desnaturizante de los 12 complejos proteicos  $G\beta_1\gamma_2$  purificados (figura 2-2-5).



**Figura 2-2-5. Inmunodetección de dímeros  $G\beta\gamma$  en condiciones no desnaturizantes (8% acrilamida).** A, “inmunoblot” correspondiente a heterodímeros  $G\beta_1\gamma_2$  purificados mediante cromatografía líquida y detectados con un anticuerpo anti- $G\gamma_2$ . B, ídem con un anticuerpo anti- $G\beta_1$ .

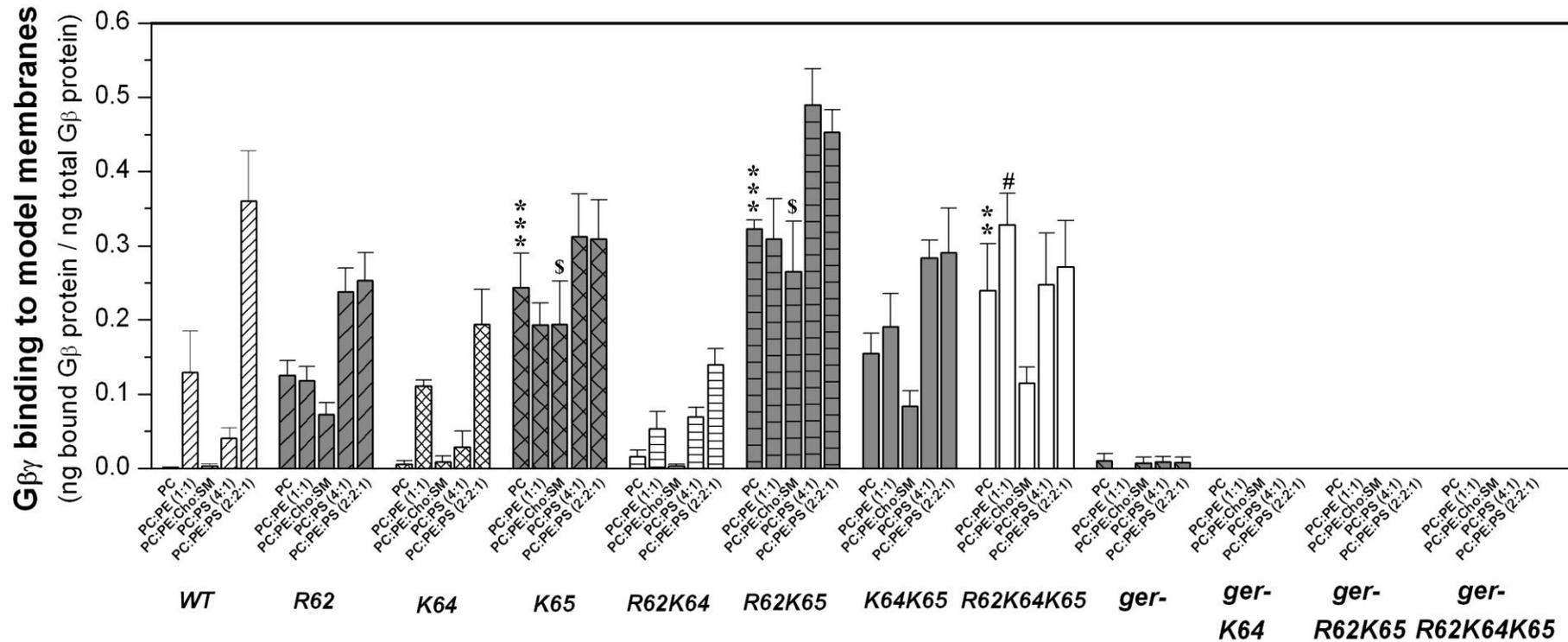
Tal y como se puede apreciar en la figura 2-2-5, el patrón de migración de los dímeros geranilgeranilados resultó ser muy diferente al de los dímeros no geranilgeranilados. En ausencia del resto geranilgeraniol, el patrón de migración de los complejos diméricos fue escalonado, siendo mayor la movilidad del dímero con menor peso molecular. El desplazamiento de este tipo de complejos disminuyó tanto más cuanto mayor fue el peso molecular del dímero, tal y como cabría esperar. En cambio, los dímeros geranilgeranilados experimentaron una movilidad electroforética reducida, muy similar entre todos ellos y notablemente inferior a la de los dímeros no geranilgeranilados.

## 2.2.2. Interacciones de dímeros $G\beta_1\gamma_2$ con membranas modelo.

La tabla 2-2-1 y la figura 2-2-6 muestran los resultados del estudio de la interacción de dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  purificados con diferentes membranas modelo representativas de diversos dominios constitutivos de las membranas biológicas.

**Tabla 2-2-1. Unión de diferentes dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  purificados, geranilgeranilados y no geranilgeranilados, a membranas modelo.** Los resultados son proporciones medias de unión de la proteína  $G\beta_1$  del complejo  $G\beta\gamma$  a vesículas lipídicas, en tanto por uno,  $\pm$  E.E.M. (n=2-8).

<i>Composición lipídica</i>					
<i>Dímeros</i>	PC	PC:PE (1:1)	PC:PE:Cho:SM	PC:PS (4:1)	PC:PE:PS (2:2:1)
<i>WT</i>	0,001 $\pm$ 0,001	0,129 $\pm$ 0,057	0,003 $\pm$ 0,003	0,04 $\pm$ 0,015	0,36 $\pm$ 0,068
<i>R62</i>	0,125 $\pm$ 0,02	0,118 $\pm$ 0,019	0,072 $\pm$ 0,016	0,237 $\pm$ 0,032	0,253 $\pm$ 0,038
<i>K64</i>	0,006 $\pm$ 0,005	0,111 $\pm$ 0,007	0,009 $\pm$ 0,008	0,029 $\pm$ 0,022	0,194 $\pm$ 0,047
<i>K65</i>	0,244 $\pm$ 0,046	0,193 $\pm$ 0,030	0,193 $\pm$ 0,059	0,313 $\pm$ 0,058	0,31 $\pm$ 0,052
<i>R62K64</i>	0,016 $\pm$ 0,009	0,053 $\pm$ 0,024	0,003 $\pm$ 0,002	0,07 $\pm$ 0,012	0,139 $\pm$ 0,022
<i>R62K65</i>	0,323 $\pm$ 0,012	0,308 $\pm$ 0,055	0,265 $\pm$ 0,068	0,489 $\pm$ 0,048	0,452 $\pm$ 0,031
<i>K64K65</i>	0,155 $\pm$ 0,027	0,191 $\pm$ 0,044	0,083 $\pm$ 0,021	0,283 $\pm$ 0,024	0,291 $\pm$ 0,06
<i>R62K64K65</i>	0,24 $\pm$ 0,063	0,328 $\pm$ 0,042	0,115 $\pm$ 0,021	0,248 $\pm$ 0,069	0,272 $\pm$ 0,062
<i>ger-</i>	0,01 $\pm$ 0,01	0 $\pm$ 0	0,007 $\pm$ 0,007	0,008 $\pm$ 0,008	0,008 $\pm$ 0,008
<i>ger- K64</i>	0 $\pm$ 0				
<i>ger- R62K65</i>	0 $\pm$ 0				
<i>ger- R62K64K65</i>	0 $\pm$ 0				

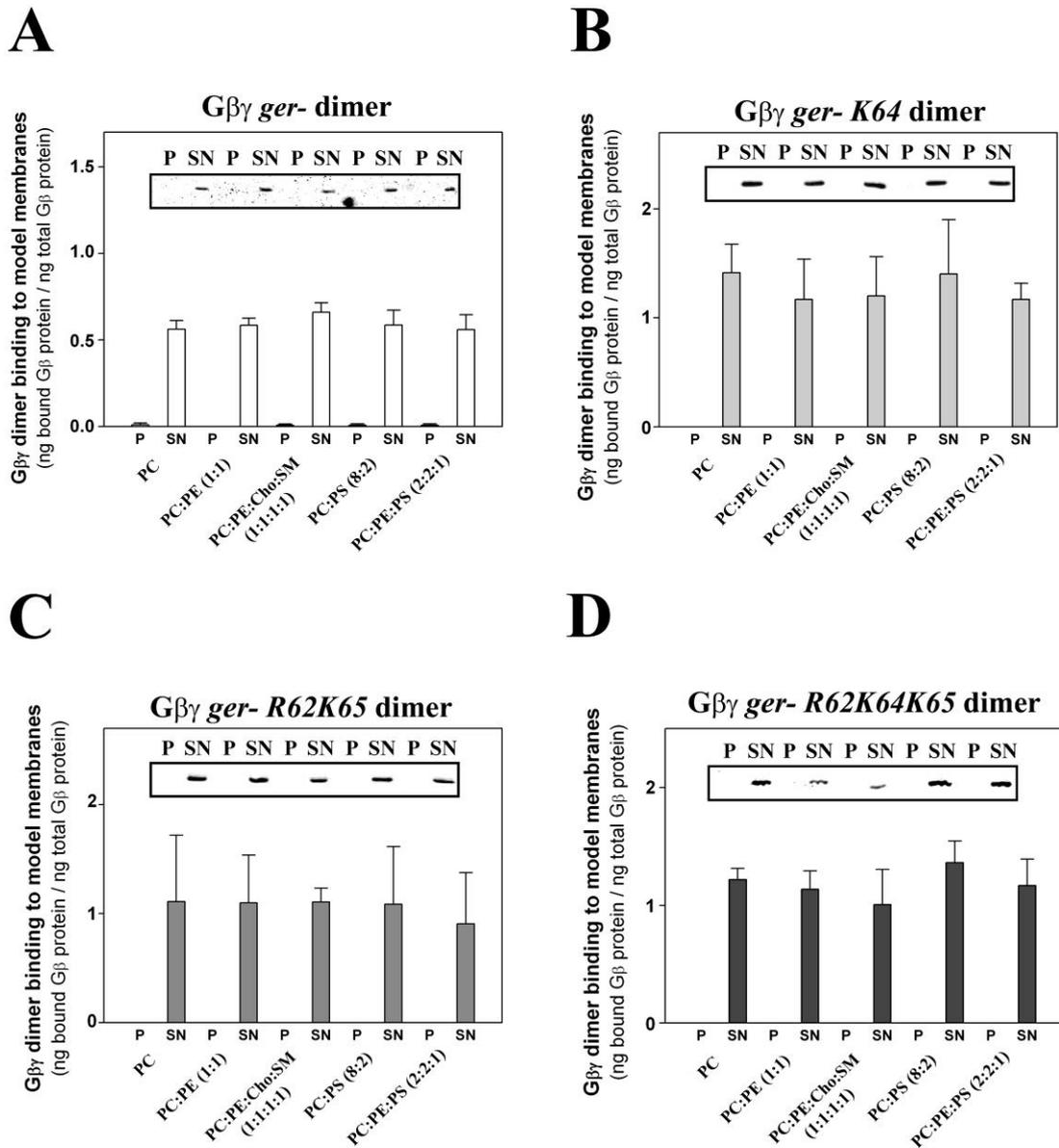


**Figura 2-2-6. Unión de dímeros Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> a membranas modelo.** En la figura aparecen representados los promedios de las proporciones de unión del complejo Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> nativo y de los diferentes mutantes producidos a membranas modelo ± E.E.M. (n=2-8). “\*” indica la existencia de diferencias significativas en la unión a PC de los distintos dímeros Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> mutados respecto a la unión a PC del dímero nativo (\*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ ). “#” indica la existencia de diferencias significativas en la unión a PC:PE de los distintos dímeros Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> mutados respecto a la unión a PC:PE del dímero nativo (#,  $p < 0,05$ ). “\$” indica la existencia de diferencias significativas en la unión a PC:PE:Cho:SM de los distintos dímeros Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> mutados respecto a la unión a tales vesículas del dímero nativo (“\$”,  $p < 0,05$ ). En todos los casos en los que hubo homogeneidad de varianzas, se aplicó un test ANOVA.

***Influencia del lípido geranylgeraniol en la interacción del dímero  $G\beta\gamma$  con membranas modelo.***

El resto de geranylgeraniol tiene un papel crítico en la unión del complejo  $G\beta_{1\gamma_2}$  a membranas lipídicas. La ausencia de esta modificación lipídica en la proteína  $G\gamma_2$  redujo de forma drástica la unión del complejo  $G\beta\gamma$  a la vesícula lipídica (figuras 2-2-6 y 2-2-7). Expresado de otra manera, la presencia del resto isoprenoide unido a la proteína  $G\gamma$  confiere al complejo dimérico la capacidad para interactuar con las membranas (Mumby et al, 1990), tal y como queda evidenciado en la gráfica de la figura 2-2-6, donde se observa que la existencia de un lípido geranylgeraniol unido a la proteína  $G\gamma$  posibilita el anclaje del heterodímero a las distintas vesículas lipídicas.

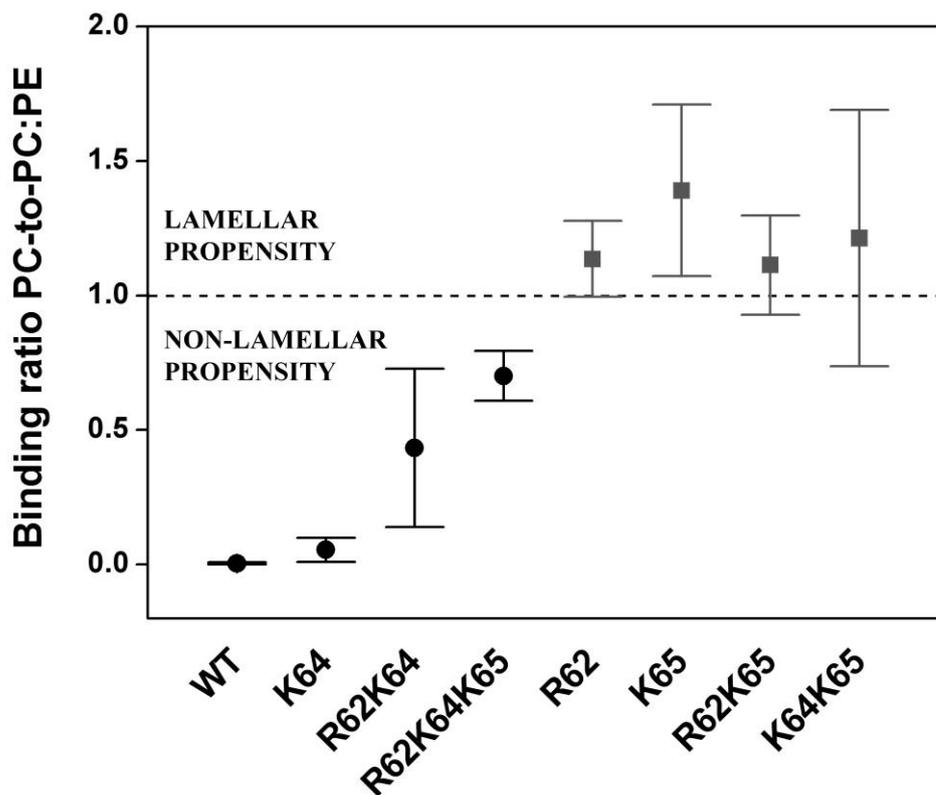
En la figura 2-2-7 se muestra la gran reducción en la unión a diferentes tipos de membranas de las cuatro construcciones generadas sin el resto geranylgeraniol. Así, en el caso de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2} ger^-$ ,  $G\beta_{1\gamma_2} ger^- K64$ ,  $G\beta_{1\gamma_2} ger^- R62K65$  y  $G\beta_{1\gamma_2} ger^- R62K64K65$ , la práctica totalidad de cada heterodímero, si no todo, se concentra en la fracción soluble. Es interesante el hecho de que el dímero  $G\beta_{1\gamma_2} ger^-$ , que no presenta mutaciones en los aminoácidos cargados, tiene una pequeña interacción con las membranas, que desaparece en los mutantes que carecen del lípido geranylgeraniol y de alguna de las cargas del dominio polibásico.



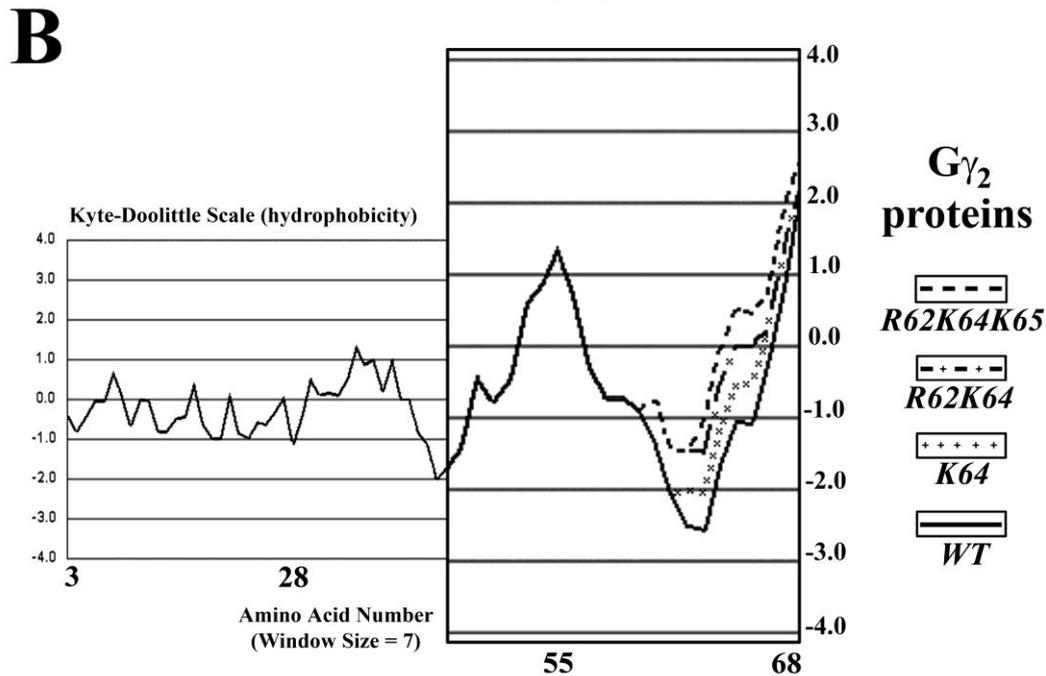
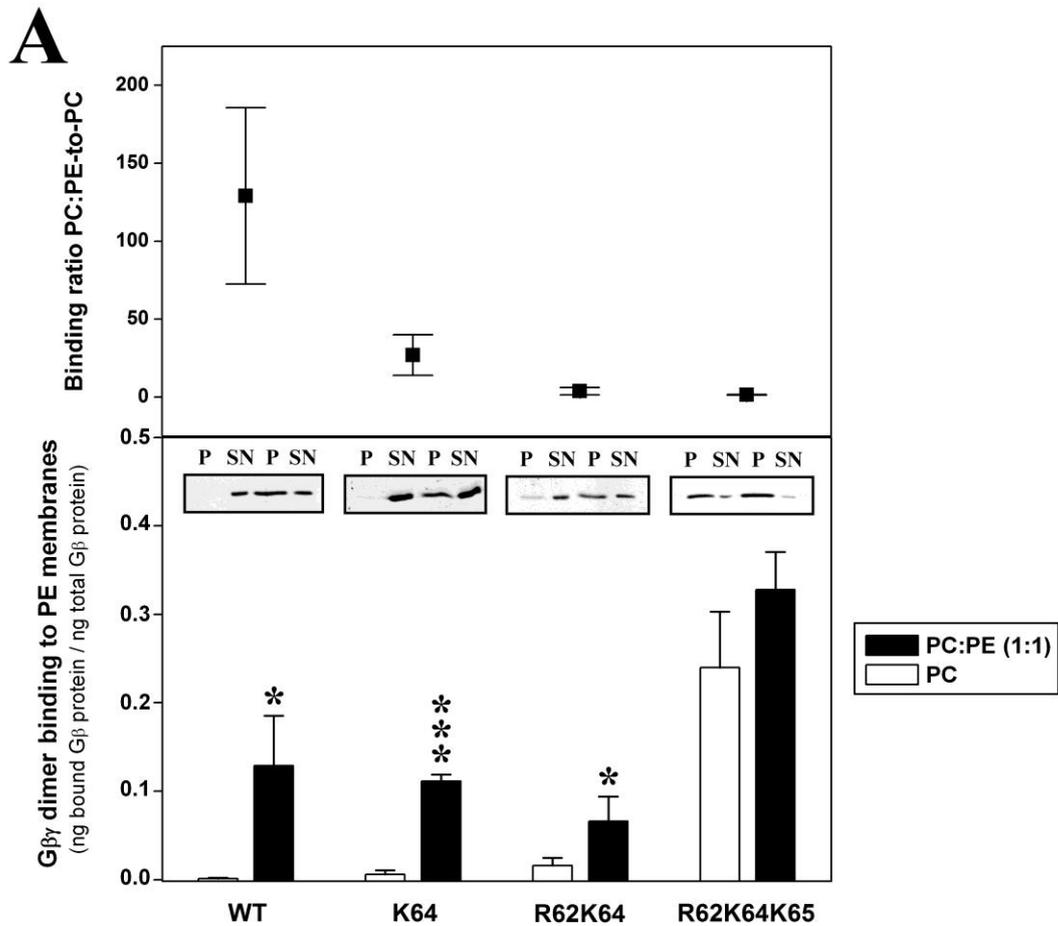
**Figura 2-2-7. Unión de dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$ , no geranilados a diferentes membranas modelo.** A, unión a membranas modelo del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con la mutación *C68S* en la proteína  $G\gamma$  (mutante *ger*<sup>-</sup>). B, unión a membranas modelo del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con las mutaciones *K64G* y *C68S* en la proteína  $G\gamma$  (*ger*<sup>-</sup> *K64*). C, unión a membranas modelo del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con las mutaciones *R62G*, *K65G* y *C68S* en la proteína  $G\gamma$  (*ger*<sup>-</sup> *R62K65*). D, unión a membranas modelo del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con las mutaciones *R62G*, *K64G*, *K65G* y *C68S* en la proteína  $G\gamma$  (*ger*<sup>-</sup> *R62K64K65*). Se muestran “inmunoblots” representativos del reparto de proteína  $G\beta$  recombinante entre las fracciones de precipitado (P) y sobrenadante (SN), correspondientes éstas a cada una de las membranas modelo consideradas. En cada figura se representó la proporción media de proteína  $G\beta$  presente en precipitado (P) y sobrenadante (SN)  $\pm$  E.E.M. (n=2-3).

*Influencia del dominio polibásico C-terminal de  $G\gamma_2$  en la interacción de  $G\beta\gamma$  con membranas modelo ricas en PE.*

Los aminoácidos básicos próximos al resto geranylgeraniol resultaron ser esenciales en las interacciones dímero  $G\beta\gamma$ -membrana lipídica. Los resultados representados en la figura 2-2-8 demuestran que mutaciones puntuales de esos aminoácidos en la región C-terminal de  $G\gamma$ , fueron capaces de inducir cambios drásticos en la interacción del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  con membranas con elevada propensión no lamelar (que contienen 50% de PE y 50% de PC).



**Figura 2-2-8. Preferencia del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  y mutantes por membranas con diferente propensión no lamelar.** Esta matriz determinó una región de preferencia lamelar y una región de preferencia no lamelar. La definición de este espacio vino dada por el cociente resultante de dividir la proporción de unión de cada dímero  $G\beta_1\gamma_2$  a vesículas de PC entre la proporción de su unión a vesículas de tipo PC:PE (50% de PE). Si el valor de ese cociente resultó ser mayor que 1, entonces el dímero se unió preferentemente a vesículas de PC (con una estructura lipídica lamelar). Si por el contrario, resultó ser menor que 1, el dímero se unió preferentemente a vesículas de PE (tendientes a formar estructuras lipídicas de tipo no lamelar).



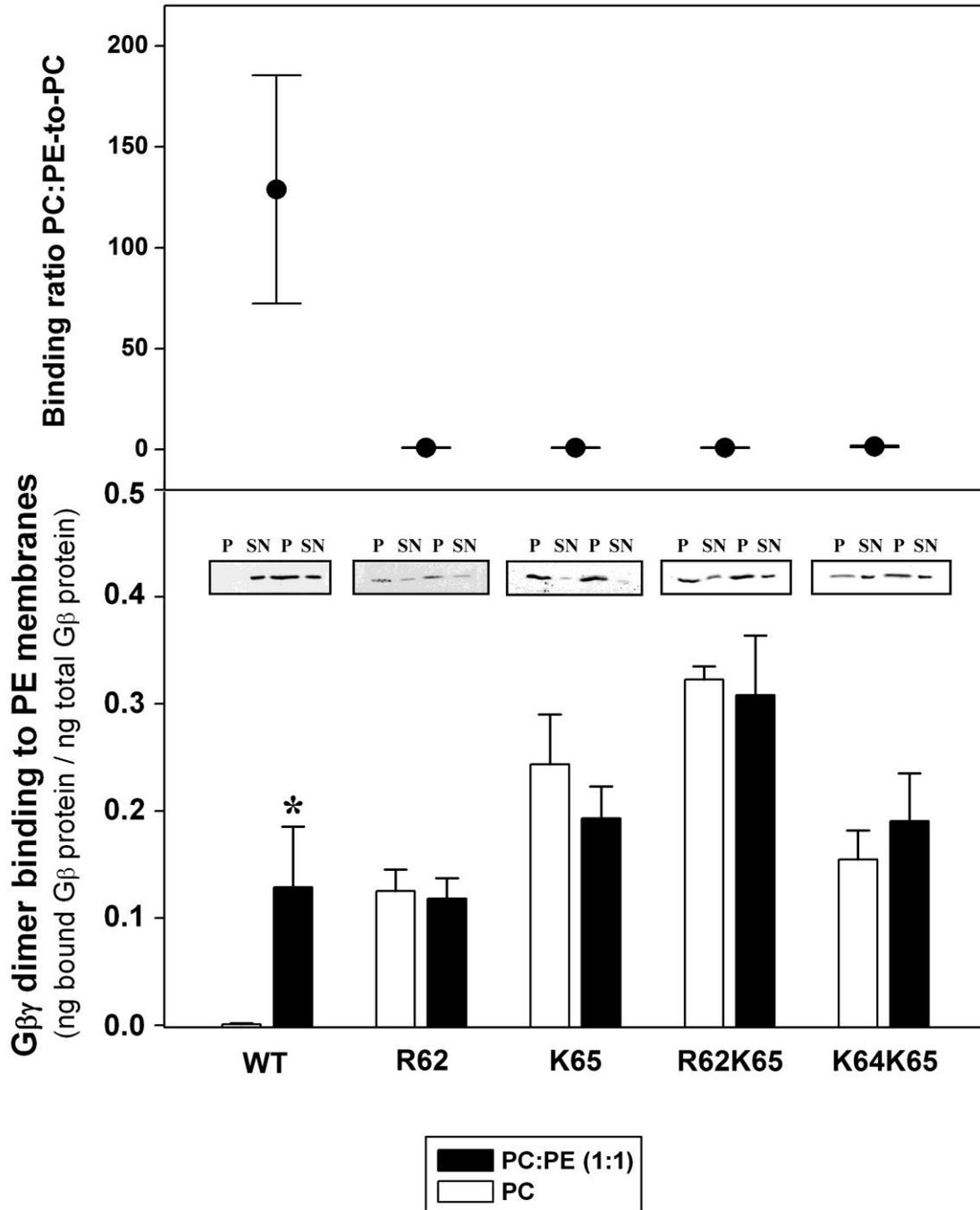
**Figura 2-2-9.** A, *panel superior*, razón de la unión a PC:PE respecto a la unión a PC de los dímeros Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> WT, Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> K64, Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> R62K64 y Gβ<sub>1</sub>γ<sub>2</sub> R62K64K65. *Panel inferior*, proporciones de unión de estos dímeros a membranas de PC y de PC:PE (1:1). Se representó, en cada caso, la proporción media de Gβ unida a vesículas ± E.E.M (n=3-6). \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ . B, curvas de hidrofobicidad de la subunidad G<sub>γ2</sub> ("Plot de Kyte-Doolittle").

El heterodímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *WT* mostró una clara y marcada preferencia por dominios lipídicos de tipo no lamelar (figuras 2-2-8, 2-2-9 y 3-2-12). Este comportamiento prevaleció en el caso de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  *WT*,  $G\beta_{1\gamma_2}$  *K64* y  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64* (figura 2-2-8), los cuales mostraron una unión significativamente mayor a vesículas con un 50% de PE que a vesículas de PC (figura 2-2-9).

Como se puede observar en la figura 2-2-9 A, la unión del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64K65* a vesículas de PC y de PE (50%, mol/mol) no se diferenció significativamente de su unión a vesículas de PC. De entre todos los dímeros con tendencia a interactuar con estructuras de tipo no lamelar, el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64K65* fue el que se situó más próximo al límite entre las dos regiones definidas por la matriz de la figura 2-2-8. Otra cuestión importante tiene que ver con la hidrofobicidad de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$ . Se observó una relación inversa entre la hidrofobicidad de la región C-terminal de  $G\gamma_2$  en los dímeros pro-no lamelares y su capacidad para interactuar preferencialmente con dominios lipídicos ricos en PE (figuras 2-2-8 y 2-2-9).

Por otro lado, los aminoácidos básicos situados en las posiciones 62 y 65 del extremo carboxilo de la proteína  $G\gamma_2$  condicionaron fuertemente la afinidad del complejo  $G\beta\gamma$  por membranas enriquecidas en PE. Así, los aminoácidos arginina-62 y lisina-65 tuvieron una importante implicación estructural en esa interacción (figuras 2-2-8, 2-2-9 y 2-2-10). Mutaciones en esos puntos de la proteína  $G\gamma_2$  tuvieron un efecto marcado sobre la desigual afinidad del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  por vesículas de tipo PC:PE o de tipo PC, haciendo que perdiera su preferencia por estructuras membranas enriquecidas en lípidos no lamelares (figuras 2-2-9 A y 2-2-10). Sólo en el caso del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con las mutaciones *R62G* y *K64G*, el cambio en lisina-64 fue capaz de compensar parcialmente el efecto de la mutación en arginina-62, de modo que el dímero  $G\beta\gamma$  continuó interactuando preferencialmente con vesículas enriquecidas en PE, al igual que el dímero *WT* (figura 2-2-9). No obstante, el perfil de unión del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64* a membranas modelo, difirió en algunos aspectos esenciales del que presentó el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *WT*, como se puede observar en la figura 2-2-9 y como se verá más adelante. El efecto compensatorio de la mutación en lisina-64 analizado anteriormente en el caso del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64* no se dio en el caso del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *K64K65*. Esto podría estar indicando que lisina-65 es, de los tres aminoácidos básicos, el que más peso tiene en las preferencias no lamelares del dímero, seguido de los otros dos aminoácidos, en el siguiente orden:

$$K65 > R62 > K64$$



**Figura 2-2-10. Unión de dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  WT,  $G\beta_1\gamma_2$  R62,  $G\beta_1\gamma_2$  K65,  $G\beta_1\gamma_2$  R62K65 y  $G\beta_1\gamma_2$  K64K65 a vesículas de PC y de PC:PE (1:1).** *Panel superior*, razón de unión a PC:PE respecto de la unión a PC de estos dímeros. *Panel inferior*, proporciones de unión de  $G\beta_1\gamma_2$  WT,  $G\beta_1\gamma_2$  R62,  $G\beta_1\gamma_2$  K65,  $G\beta_1\gamma_2$  R62K65 y  $G\beta_1\gamma_2$  K64K65 a membranas de PC y de PC:PE (1:1). No se observaron diferencias significativas en la unión de los dímeros mutados a vesículas de PC:PE (1:1), respecto a la que mostraron en presencia de vesículas de PC. En el caso del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  K65, su unión a vesículas de PC:PE fue incluso menor que a vesículas de PC, aunque no de manera significativa. Se muestran “immunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los resultados representados corresponden a la proporción media de unión de G $\beta$  a vesículas  $\pm$  E.E.M (n=4-8). \*,  $p < 0,05$ .

Así, mientras que los aminoácidos arginina-62 y lisina-65 resultaron ser claves en la definición del carácter pro-no lamelar del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$ , el aminoácido lisina-64 no ejerció influencia alguna en ese sentido (figuras 2-2-8 y 2-2-9). La sustitución de lisina-64 por glicina no modificó significativamente el perfil de unión del dímero  $G\beta\gamma$  *WT* a vesículas lipídicas, salvo en lo concerniente a las interacciones de tipo electrostático, que se analizarán a continuación.

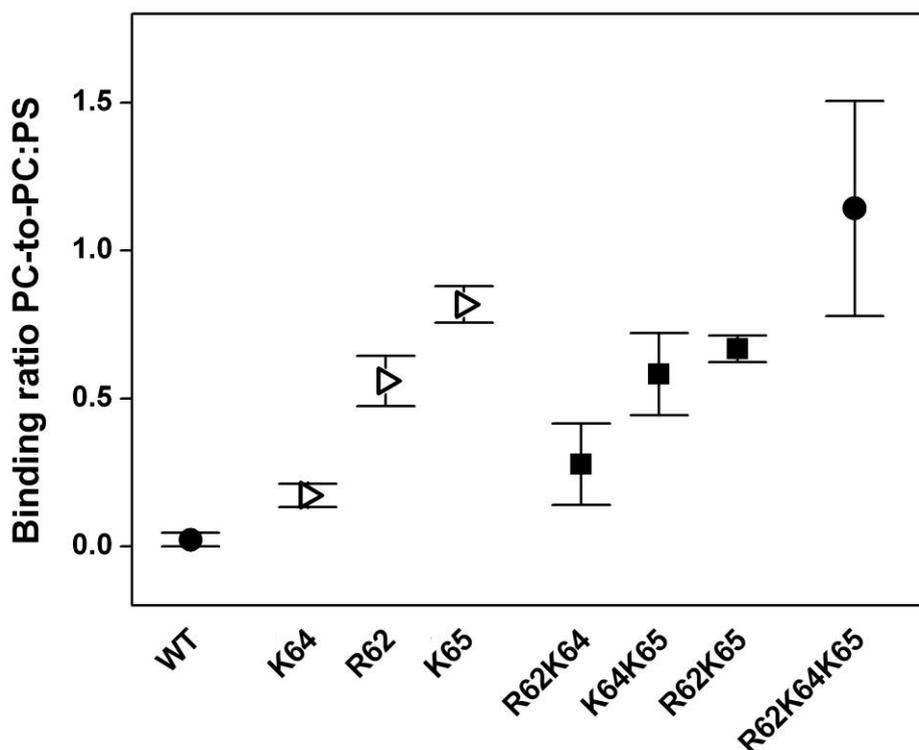
***Influencia de los aminoácidos básicos C-terminales de  $G\gamma_2$  en la interacción de  $G\beta\gamma$  con membranas de PC y PS.***

Tal y como era de esperar, el cambio de aminoácidos con carga positiva situados en el extremo C-terminal de  $G\gamma_2$  por aminoácidos neutros, afectó a la capacidad de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  para interaccionar con vesículas que contienen el fosfolípido aniónico PS. La figura 2-2-11 ilustra de una manera clara el efecto de esas mutaciones en la unión de los dímeros geranilados a vesículas de tipo PC:PS (4:1). El dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *WT* mostró la mayor afinidad y diferencia en la unión a membranas de PS (20% mol/mol) respecto a su interacción con membranas de PC. Así, el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *WT* fue el que mostró un menor valor de esa relación (es decir, mayor unión a membranas con PS en relación a las que no tienen PS: figura 2-2-11). Por el contrario, el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64K65* tuvo un valor promedio de la razón de unión a PC respecto a la unión a PC:PS ligeramente superior a 1, lo que indica que la presencia de arginina y lisina en la región C-terminal de la proteína  $G\gamma_2$  facilita la interacción del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con regiones de membrana ricas en PS, y que su desaparición elimina la preferencia del dímero por regiones de membrana con carga negativa.

Entre estos valores límite de la razón de unión a PC respecto a la unión a PC:PS correspondiente a los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  *WT* y  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64K65*, se situaron los del resto de dímeros geranilados estudiados. El dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64* tuvo una razón de unión a PC respecto a la unión a PC:PS mayor que  $G\beta_{1\gamma_2}$  *K64K65*; y la de éste, a su vez, fue mayor que la del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K65* (figura 2-2-11). Si tenemos en cuenta que estos dobles mutantes únicamente conservan intacto uno de los tres aminoácidos estudiados, este orden decreciente en el valor de la razón estudiada podría estar correlacionado con la capacidad individual de cada aminoácido básico para influir en la interacción del

dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con vesículas de PS (20% mol/mol). Así, la ordenación hipotética de ese potencial podría ser la siguiente:

$$K65 > R62 > K64$$



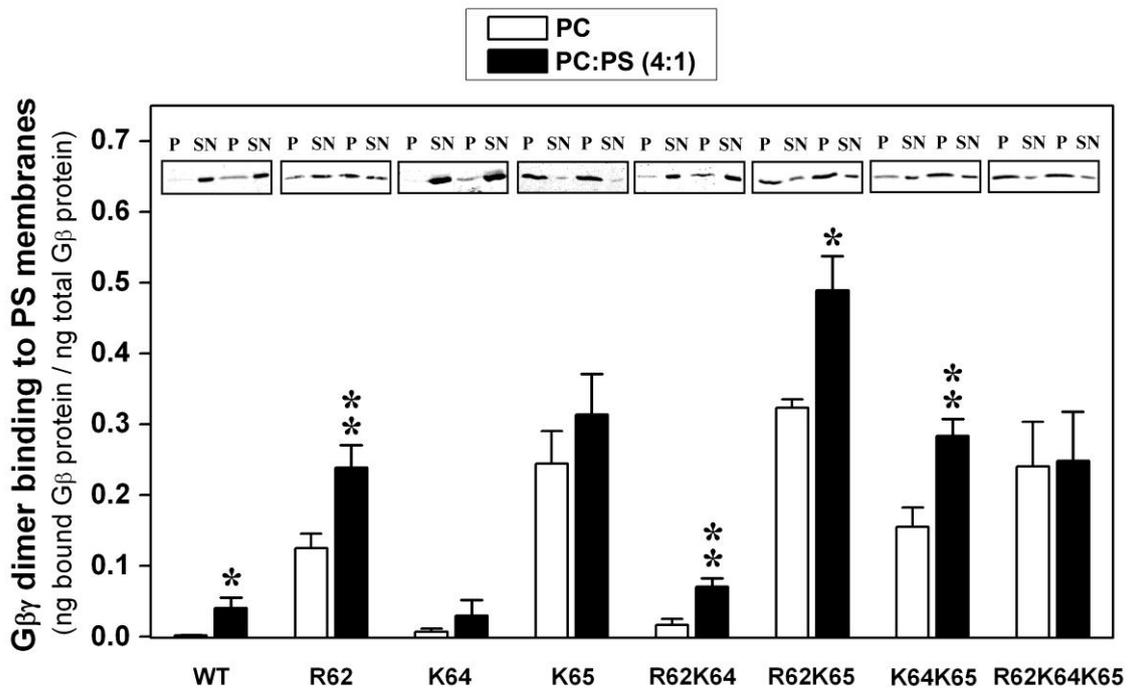
**Figura 2-2-11. Preferencia del dímero  $G\beta\gamma$  y mutantes por membranas con diferente carga superficial.** Se representan los valores relativos correspondientes a la relación de la unión de cada dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  a vesículas de PC respecto a la unión a PC:PS (20% mol/mol).

Continuando con el anterior razonamiento, se podría analizar también la unión de los dímeros con una única mutación a membranas modelo de PC y PC:PS. Así, si los aminoácidos *K65* y *R62* son los que realmente tienen un mayor potencial para influir en la unión a membranas de PS, entonces el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *K64* debería de ser el de menor relación de unión a PC respecto a la unión a PC:PS, considerando los tres mutantes sencillos. De acuerdo con este razonamiento, el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *K64* debería tener una relación de unión a PC respecto a PC:PS menor que el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62* y, éste a su vez, menor que el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *K65*. En la figura 2-2-11 se puede ver representada esta misma ordenación, de manera que los resultados coinciden con la predicción realizada, lo que refuerza la hipótesis propuesta.

Curiosamente, el orden en el que los distintos aminoácidos básicos influyeron en la unión a vesículas de PS fue el mismo que en el caso de la unión a vesículas de PE. Estos

resultados ponen de manifiesto la gran implicación de tales aminoácidos en la movilización del dímero  $G\beta\gamma$  a determinados dominios lipídicos, y sugieren que R62 y K65 están más cerca de la interfase membrana citosol que K64.

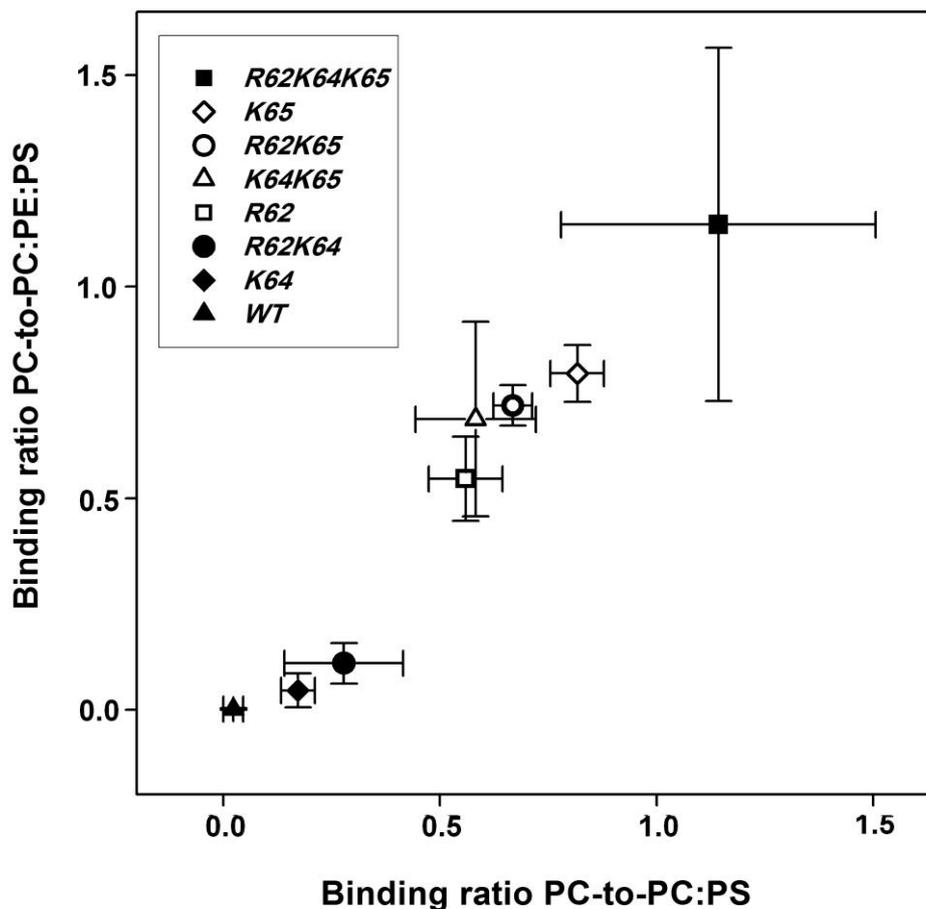
La figura 2-2-12 muestra los cambios en la unión de los diferentes dímeros a vesículas de tipo PC:PS (4:1) respecto a la unión que experimentaron a vesículas de PC. Con excepción de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  R62K64K65,  $G\beta_{1\gamma_2}$  K64 y  $G\beta_{1\gamma_2}$  K65, en todos los demás casos, la unión a vesículas de PS fue significativamente mayor que a vesículas de PC (figura 2-2-12). En el caso del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  R62K64K65, la unión a ambos tipos de vesículas fue muy similar, a diferencia de lo que ocurrió con los otros dos dímeros,  $G\beta_{1\gamma_2}$  K64 y  $G\beta_{1\gamma_2}$  K65, que tendieron a unirse más a vesículas de PS, aunque no de manera significativa (figura 2-2-12).



**Figura 2-2-12. Unión de dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  a vesículas de PC y de PC:PS (4:1).** Se observaron diferencias significativas en la unión a vesículas de PC:PS (4:1) de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  WT y  $G\beta_{1\gamma_2}$  R62, y de los tres dímeros prenilados con mutaciones dobles, respecto a su unión a vesículas de PC. En el caso del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  R62K64K65, su unión a vesículas de PC:PS fue prácticamente la misma que a vesículas de PC. Se muestran “immunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los resultados representados corresponden a la proporción media de unión de  $G\beta$  a vesículas  $\pm$  E.E.M (n=3-8). \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .

*Influencia de los aminoácidos básicos C-terminales de  $G\gamma_2$  en la interacción de  $G\beta\gamma$  con membranas de PC, PE y PS.*

Los mutantes investigados mostraron una interacción diferencial respecto al WT en su unión a membranas que contienen PE ó PS, los fosfolípidos mayoritarios en la monocapa interna de la membrana plasmática. Por ello, se investigó la interacción de dímeros  $G\beta\gamma$  con membranas compuestas por PC, PE y PS.



**Figura 2-2-13. Distribución diferencial del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  WT y de los dímeros prenilados mutados, a partir de su interacción con membranas de PC, PC:PS (4:1) y PC:PE:PS (2:2:1).** Estas diferentes agrupaciones de dímeros geranilados fueron el resultado de representar, en el eje de abscisas, el cociente que se obtiene de dividir la proporción media de unión de cada dímero a vesículas de tipo PC entre la proporción media de su unión a vesículas de tipo PC:PS (4:1). Para completar el gráfico, en ordenadas se representó el valor relativo resultante de dividir la proporción media de unión de los dímeros anteriores a vesículas de PC entre la proporción media de su unión a vesículas de tipo PC:PE:PS (2:2:1). Junto con los valores promedio de los diferentes cocientes, se representaron en ambos ejes los errores estándar de la media correspondientes.

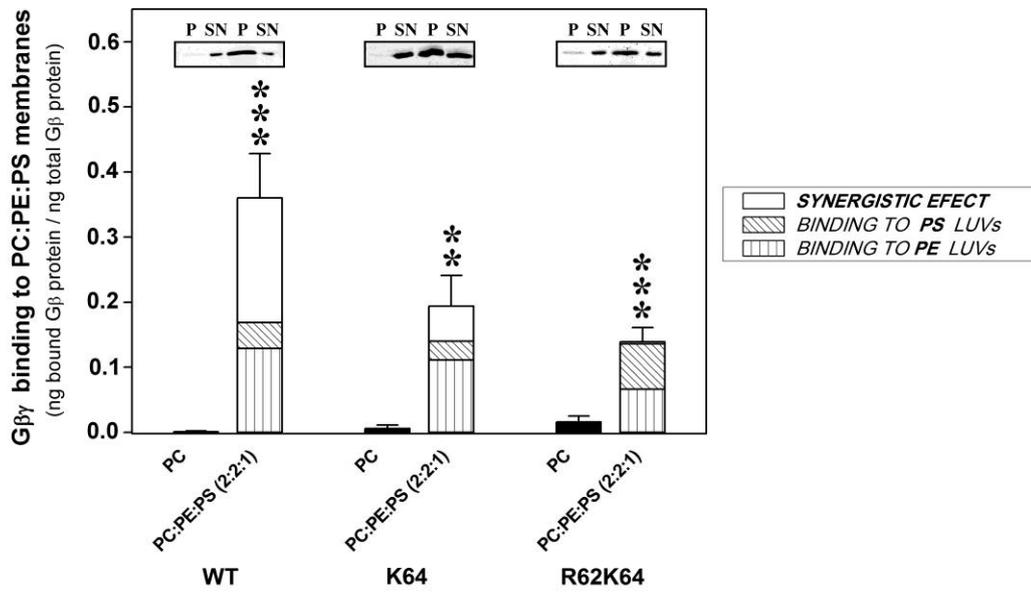
Cuando se representó la razón de la unión a PC respecto a la unión a PC:PE:PS frente a la razón de la unión a PC respecto a la unión a PC:PS, para cada uno de los dímeros prenilados estudiados, quedaron configurados tres grupos de dímeros, algunos de ellos

sorprendentemente coincidentes con otros grupos de dímeros obtenidos anteriormente mediante planteamientos diferentes (figura 2-2-13).

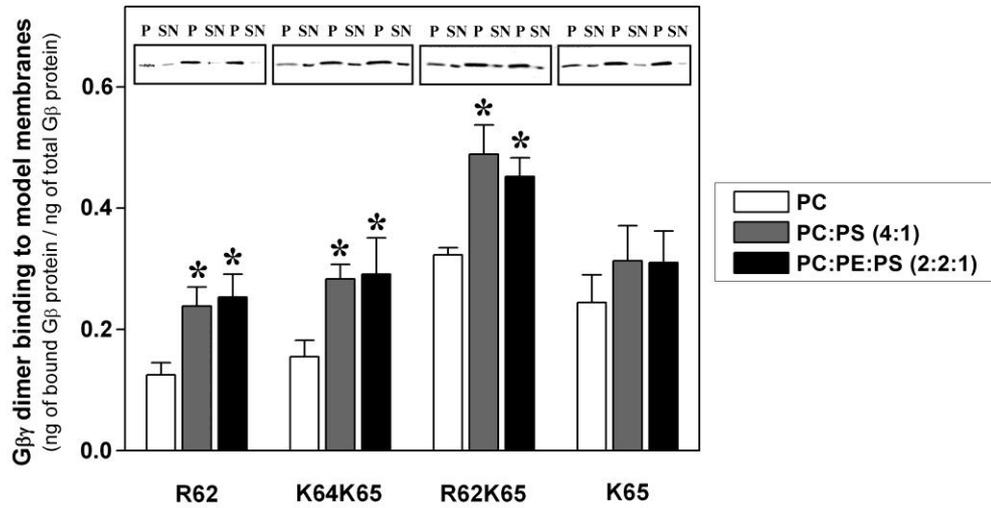
De los tres grupos de dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  que surgen en la representación de la figura 2-2-13, el grupo con valores de relación intermedios en uno y otro eje de coordenadas correspondió a los mismos dímeros que formaron parte del espacio de propensión lamelar de la figura 2-2-8. Así, las figuras 2-2-8, 2-2-13 y 2-2-14 ponen de manifiesto que los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2} R62$ ,  $G\beta_{1\gamma_2} K65$ ,  $G\beta_{1\gamma_2} R62K65$  y  $G\beta_{1\gamma_2} K64K65$  tuvieron entre ellos un comportamiento muy similar en la unión a membranas modelo de tipo PC:PS, PC:PE y PC:PE:PS, y diferente al del resto de dímeros geranilados estudiados. Todos estos dímeros mostraron una unión a vesículas de tipo PC:PE:PS parecida a la que se dio en presencia de membranas de tipo PC:PS, y en ambos casos fue significativamente mayor que la unión a vesículas de PC (figura 2-2-14 B). Sólo en el caso del dímero  $G\beta_{1\gamma_2} K65$  no hubo diferencias significativas (figura 2-2-14 B). Aunque este dímero tendió a unirse más a vesículas constituídas por PS, su perfil de unión a este tipo de vesículas fue el que más se acercó al de  $G\beta_{1\gamma_2} R62K64K65$ . El dímero con la triple mutación constituyó él mismo una categoría aparte del resto de dímeros geranilados (figura 2-2-13), y se caracterizó por carecer de preferencia por membranas enriquecidas en PE o PS, es decir, por manifestar idéntico grado de unión a vesículas de tipo PC:PS (4:1) y PC:PE:PS (2:2:1) que a vesículas de PC (figuras 2-2-13 y 2-2-14 C).

**Figura 2-2-14. Unión de dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  geranilados a vesículas de PC, de PC:PS (4:1) y de PC:PE:PS (2:2:1).** A, interacción de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2} WT$ ,  $G\beta_{1\gamma_2} K64$  y  $G\beta_{1\gamma_2} R62K64$  con membranas de PC y de PC:PE:PS. Dentro de cada una de las barras que representa la proporción de unión a vesículas de tipo PC:PE:PS, se trazaron las barras correspondientes a la proporción media de unión a vesículas de PS y a la proporción de unión a vesículas de PE, además de una tercera componente que considera el efecto sinérgico de los lípidos PE y PS en esa interacción. B, interacción de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2} R62$ ,  $G\beta_{1\gamma_2} K64K65$ ,  $G\beta_{1\gamma_2} R62K65$  y  $G\beta_{1\gamma_2} K65$  con vesículas de PC, PC:PS y PC:PE:PS. C, unión de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2} WT$  y  $G\beta_{1\gamma_2} R62K64K65$  a membranas de PC, PC:PS y PC:PE:PS. Los perfiles de interacción de ambos heterodímeros fueron muy diferentes. Se muestran “inmunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los resultados representados corresponden a la proporción media de unión de  $G\beta$  a vesículas  $\pm$  E.E.M (n=3-8). \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ . “#” indica la existencia de diferencias significativas en la unión a PC:PE:PS (2:2:1), respecto a la unión a PC:PS (4:1).

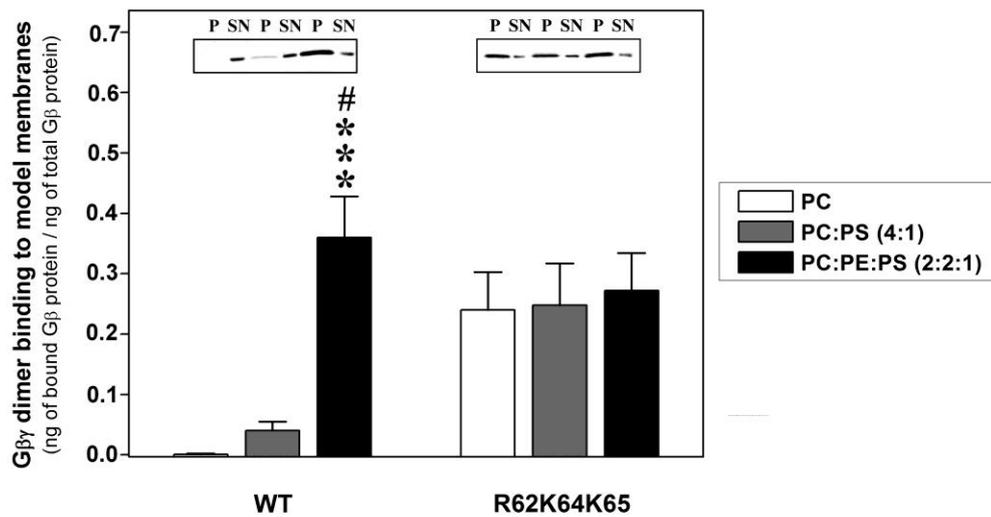
**A**



**B**



**C**

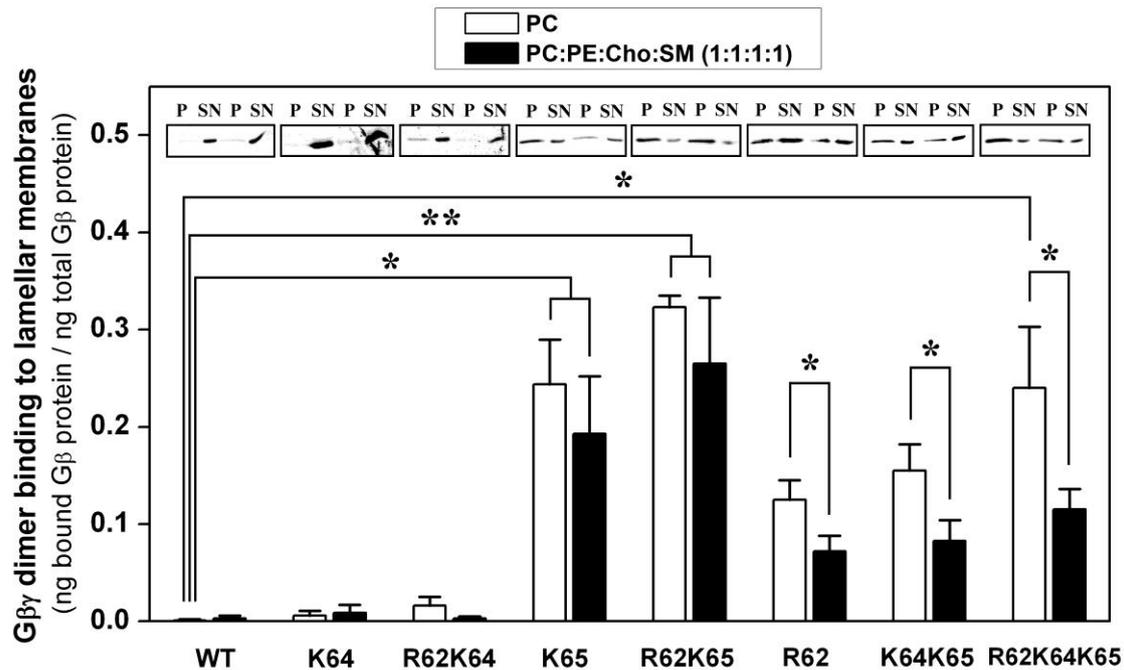


Mención aparte merecen los dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  *WT*,  $G\beta_1\gamma_2$  *K64* y  $G\beta_1\gamma_2$  *R62K64*. Los tres constituyeron un grupo claramente distanciado del resto de dímeros prenilados estudiados (figura 2-2-13). Esto se debió a la mayor afinidad que mostraron estos dímeros por vesículas de PC:PS que por vesículas de PC. Más aún, la capacidad de estos dímeros para unirse a membranas de tipo PC:PE:PS fue incluso mayor que la que tuvieron en presencia de vesículas constituídas por PC y PS (figuras 2-2-13 y 2-2-14 A).

Tal y como ya se ha indicado anteriormente, los dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  *WT*,  $G\beta_1\gamma_2$  *K64* y  $G\beta_1\gamma_2$  *R62K64* mostraron una marcada afinidad por estructuras lipídicas pro-no lamelares (figura 2-2-9 A) y una mayor afinidad por vesículas de tipo PC:PS que por vesículas de PC (figura 2-2-12). En la figura 2-2-14 A aparece el efecto de los fosfolípidos PE y PS por separado y de forma conjunta. Si bien en el caso de los dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  *WT* y  $G\beta_1\gamma_2$  *K64* se observó un efecto sinérgico de PE y PS en su unión a membranas modelo de tipo PC:PE:PS, esa sinergia pareció desaparecer en el caso del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  *R62K64* (figura 2-2-14 A). No obstante, independientemente de la existencia o no de sinergias, existió una influencia conjunta y claramente positiva de los lípidos PE y PS en la mayor unión de los dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  *WT*,  $G\beta_1\gamma_2$  *K64* y  $G\beta_1\gamma_2$  *R62K64* a vesículas de tipo PC:PE:PS que a vesículas de PC, siendo las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ; figura 2-2-14 A).

### ***Influencia de los aminoácidos básicos C-terminales de $G\gamma_2$ en la interacción de $G\beta\gamma$ con membranas de PC, PE, Cho y SM.***

Al analizar la interacción de los distintos dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  recombinantes con membranas modelo de PC, por un lado, y con membranas constituídas por PC, PE, Cho y SM (modelo de “lipid raft”) por otro, se pudo observar un notable paralelismo. Así, la unión de los dímeros pro-no lamelares  $G\beta_1\gamma_2$  *WT*,  $G\beta_1\gamma_2$  *K64* y  $G\beta_1\gamma_2$  *R62K64* a membranas de PC y de PC, PE, Cho y SM fue baja, no habiendo diferencias significativas entre ambos tipos de interacción (figura 2-2-15). Por otra parte, el marcado incremento en la unión de los restantes dímeros geranilados a membranas de PC también se correspondió con una mayor unión de todos ellos a membranas de PC, PE, Cho y SM.



**Figura 2-2-15. Unión de dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  a vesículas de PC y de PC:PE:Cho:SM (1:1:1:1).** Las barras muestran la proporción de unión de los diferentes dímeros a membranas pro-lamelares de PC (barras blancas) o PC:PE:Cho:SM (barras negras). Se muestran “inmunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los resultados representados corresponden a la proporción media de unión de  $G\beta$  a vesículas  $\pm$  E.E.M. (n=3-8). \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .

La mutación en el aminoácido lisina-65 provocó un aumento drástico en la interacción del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con membranas lipídicas con estructura de tipo lamelar. Si además también está mutado el aminoácido arginina-62, ese aumento es aún mayor. El efecto de sustituir sólo el aminoácido arginina-62 no fue tan importante como el de mutar la lisina-65. El cambio de lisina-64 por glicina tendió a contrarrestar el efecto de mutar lisina-65, en el caso del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *K64K65*, y también la tendencia a una mayor unión que supone mutar arginina-62 y lisina-65, en el caso del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64K65*. Este efecto contrario de la mutación en el aminoácido lisina-64 se puso una vez más de manifiesto en el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64*, con un perfil de interacción con membranas lamelares muy similar al del dímero WT y distanciándose claramente de los perfiles asociados a cambios en arginina-62 y lisina-65.

En el caso de los dímeros  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62*,  $G\beta_{1\gamma_2}$  *K64K65* y  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K64K65*, hubo diferencias significativas entre la unión a vesículas de PC y a vesículas de tipo PC:PE:Cho:SM (figura 2-2-15). Así, la ausencia del aminoácido arginina-62 provocó una unión significativamente menor del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62* a membranas de tipo PC:PE:Cho:SM, con respecto a su unión a vesículas de PC. No hubo diferencias

significativas en el caso del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  *K65*, mientras que el dímero  $G\beta_1\gamma_2$  *K64K65* tuvo un comportamiento similar a  $G\beta_1\gamma_2$  *R62* (figura 2-2-15). De hecho, en lo que respecta a la interacción de estos dos últimos dímeros con la totalidad de membranas modelo estudiadas, los cambios de lisina-64 y lisina-65 a glicina tuvieron el mismo efecto que la sustitución de arginina-62 por glicina. Como cabría esperar, teniendo en cuenta los anteriores resultados, la triple mutación en los aminoácidos básicos C-terminales de  $G\gamma_2$  también provocó una unión significativamente menor del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  *R62K64K65* a membranas de tipo PC:PE:Cho:SM que a PC.

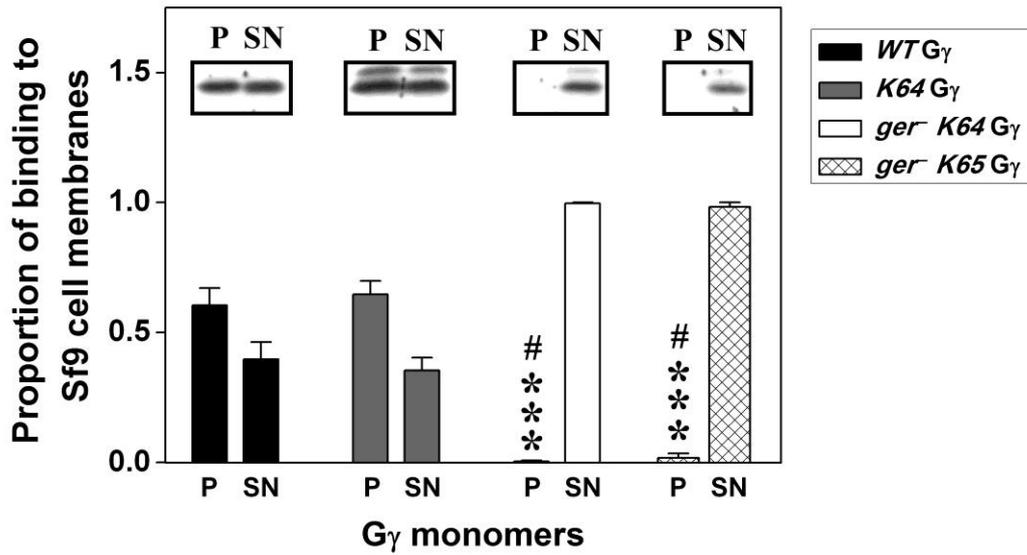
Estos resultados demuestran la importancia de los aminoácidos de la región C-terminal de la subunidad  $G\gamma_2$  en la falta de afinidad del dímero  $G\beta\gamma$  por membranas formadas por lípidos con alta propensión lamelar.

### **2.2.3. Interacción de las proteínas $G\gamma_2$ , $G\beta_1$ y de los heterodímeros $G\beta_1\gamma_2$ con membranas biológicas.**

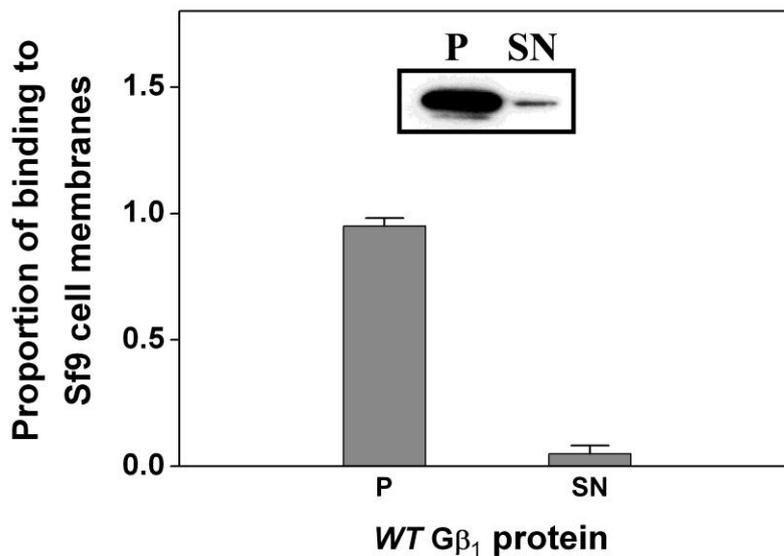
#### *Unión de proteínas $G\beta_1$ y $G\gamma_2$ , expresadas por separado en células Sf9, a la fracción de membranas.*

La ausencia de geranilgeranilo en la proteína  $G\gamma_2$  provocó un cambio drástico en el reparto de dicha proteína entre la fracción de membranas y la fracción citosólica de células Sf9. Mientras que la proteína  $G\gamma_2$  geranilada se halló principalmente presente en la fracción de membranas, la no geranilada se localizó en la fracción citosólica (figura 2-2-16 A). Como ya se demostrara en el anterior capítulo, y de acuerdo con trabajos previos (Bigay et al, 1994), las modificaciones lipídicas de las proteínas G tienen un papel crucial en el anclaje de éstas a las membranas lipídicas. Así pues, también en este capítulo dedicado al estudio de la interacción del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  con membranas lipídicas, la ausencia de modificación lipídica en la proteína  $G\gamma_2$  constituyó un hecho determinante (figuras 2-2-6 y 2-2-7).

**A**



**B**



**Figura 2-2-16. Interacción de proteínas G $\gamma_2$  y G $\beta_1$ , sobreexpresadas por separado, con membranas de células Sf9.** A, unión de proteínas G $\gamma_2$  WT, G $\gamma_2$  K64, G $\gamma_2$  ger- K64 y G $\gamma_2$  ger- K65 a membranas totales de células Sf9. B, unión de proteína G $\beta_1$  a membranas totales de células Sf9. Se muestran “inmunoblots” representativos de cada experimento de unión. Se representó el reparto en tanto por uno de las distintas proteínas estudiadas entre las fracciones de pellet y sobrenadante y el error estándar de la media (n=3-5). \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ . # indica la existencia de diferencias significativas en la unión de las proteínas G $\gamma_2$  ger- K64 y G $\gamma_2$  ger- K65 a membranas totales, respecto a la unión de la proteína G $\gamma_2$  K64.

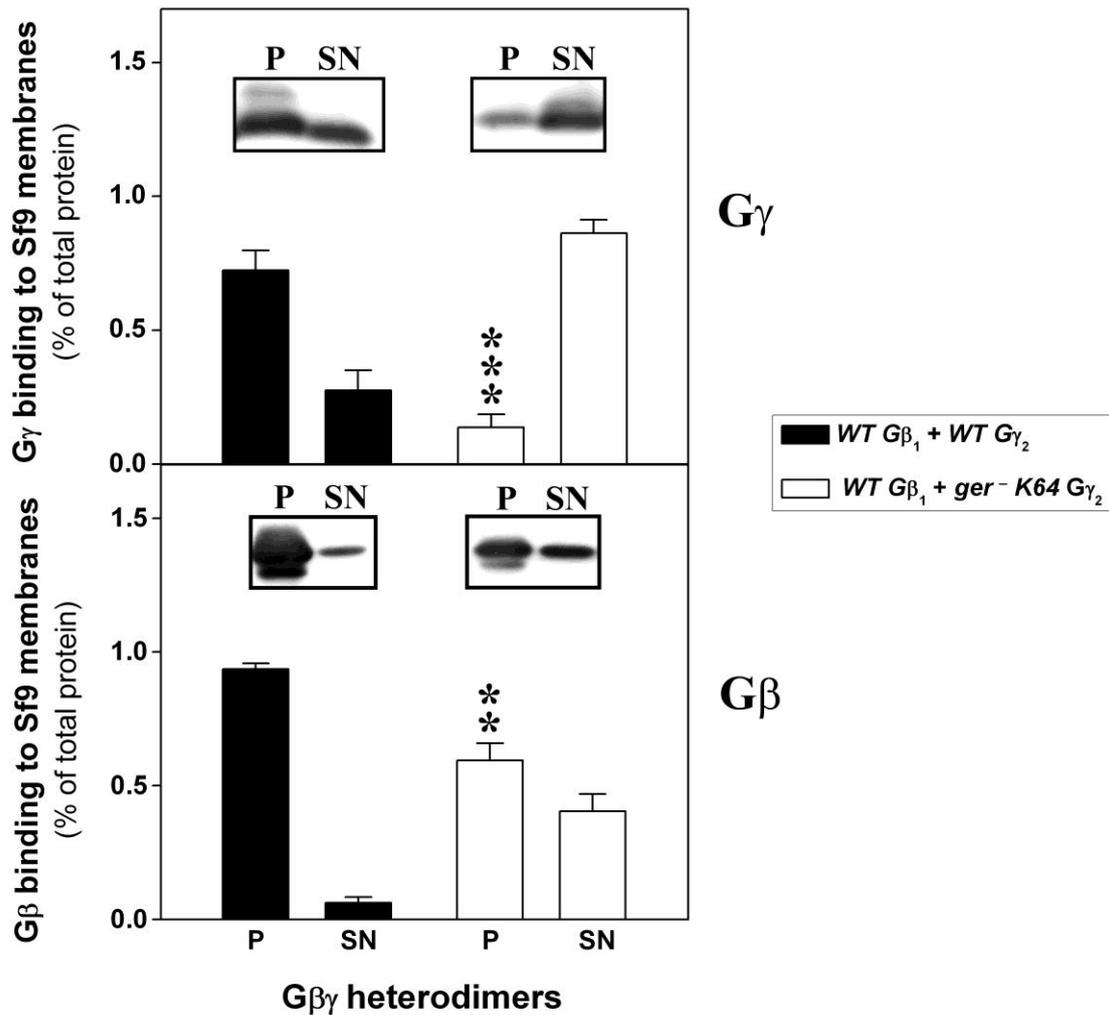
Por su parte, la proteína  $G\beta_1$  mostró un comportamiento curioso a pesar de no portar modificación lipídica alguna. La práctica totalidad de la proteína se halló asociada a la fracción de membranas totales de células Sf9 (figura 2-2-16 B). Este resultado aparentemente extraño, asociado a una proteína de bajo perfil hidrofóbico, tiene su explicación en la capacidad de  $G\beta_1$  para asociarse con componentes del citoesqueleto, que quedarían incluidos en el pellet de membranas como consecuencia de la ultracentrifugación diferencial (Carlson et al, 1986). También podría deberse a un plegamiento erróneo en ausencia de  $G\gamma$ , quedando desenmascaradas regiones hidrofóbicas de la proteína.

### ***Unión de proteínas $G\beta_1$ y $G\gamma_2$ , coexpresadas en células Sf9, a la fracción de membranas.***

Las proteínas  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$  que constituyen el complejo  $G\beta\gamma$  WT se hallaron presentes mayoritariamente en la fracción de membranas de células Sf9 (figura 2-2-17). El ensamblaje de la proteína  $G\beta_1$  con la proteína  $G\gamma_2$  da lugar a un complejo heterodimérico cuya unión a la bicapa lipídica ocurre por medio del resto geranylgeraniol, isoprenoide de 20 carbonos, tal y como se demuestra en el apartado 2.2.2.

La proteína  $G\gamma_2$ , sin el resto isoprenoide y con el aminoácido lisina-64 mutado a glicina, liberó una proporción importante de proteína  $G\beta_1$  de la fracción de membranas (figura 2-2-17), fracción en la que  $G\beta_1$  apareció de forma predominante cuando fue sobreexpresada sólo en células Sf9 (figura 2-2-16 B). Conviene tener en cuenta que las proporciones de proteína  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$  en las fracciones de pellet y citosol, mostradas en la figura 2-2-17, no revelan la cantidad de proteína recombinante de cada tipo que hay libre dentro de las células, respecto a la que hay formando parte del complejo heterodimérico  $G\beta_1\gamma_2$ .

En cualquier caso, este resultado fue muy relevante al poner de manifiesto la influencia crítica de la región carboxi-terminal de la proteína  $G\gamma_2$  y, más concretamente del grupo geranylgeraniol, en la unión del complejo  $G\beta\gamma$  a membranas biológicas, en correspondencia clara con el perfil de unión del heterodímero a membranas modelo.



**Figura 2-2-17. Interacción de proteínas  $G\gamma_2$  y  $G\beta_1$ , sobreexpresadas juntas, con membranas totales de células Sf9.** En la parte superior, se muestra la interacción de las proteínas  $G\gamma_2$  WT y  $G\gamma_2$  *ger*<sup>-</sup> K64 con membranas totales de células Sf9, cuando se sobreexpresaron junto con la proteína  $G\beta_1$ . En la parte inferior, se muestra la interacción de la proteína  $G\beta_1$  correspondiente a cada condición de coexpresión. Se representó el reparto en tanto por uno de las distintas proteínas estudiadas entre las fracciones de pellet y sobrenadante y el error estándar de la media (n=2-7). \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ .

## Capítulo 3.

# BASES MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN DE $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ CON MEMBRANAS LIPÍDICAS

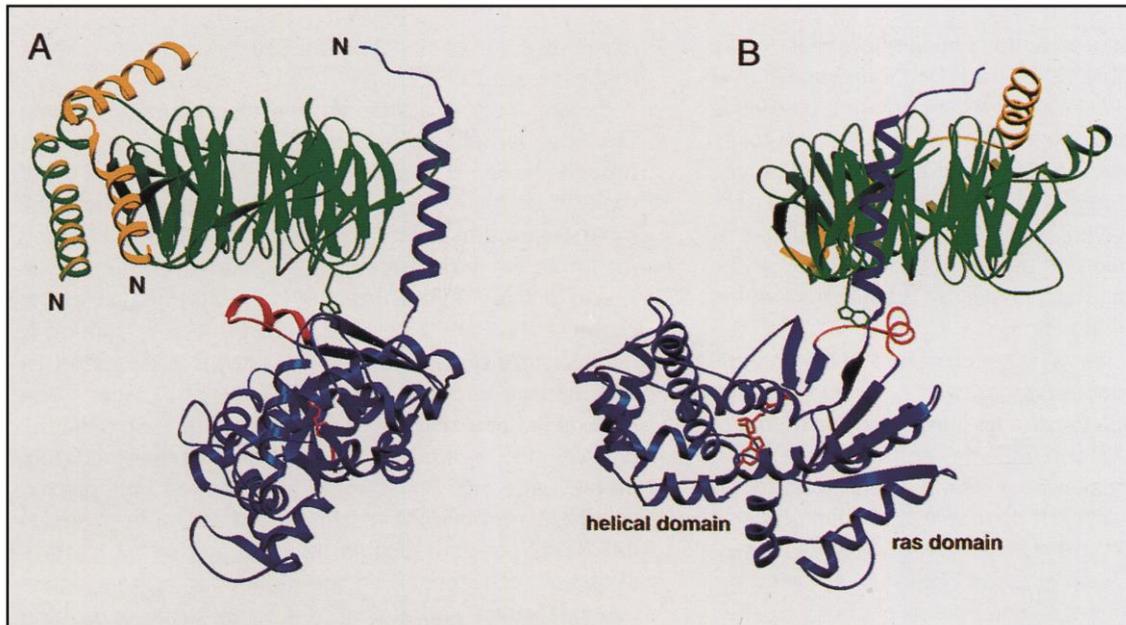
### 3.1. INTRODUCCIÓN

#### 3.1.1. Estructura de las proteínas G heterotriméricas.

##### 3.1.1.1. Caracterización estructural de la interacción entre la proteína $G\alpha$ y el heterodímero $G\beta\gamma$ .

Los estudios de difracción de rayos X apuntan a que el anclaje del complejo heterotrimérico  $G\alpha\beta\gamma$  a la membrana tiene lugar por un único punto, en el que convergen el extremo carboxilo de la proteína  $G\gamma_2$  y el extremo amino de la proteína  $G\alpha_1$ . Ésta última proteína interacciona con el heterodímero  $G\beta\gamma$  a través de dos regiones críticas. Una de estas regiones corresponde al *cluster*  $\beta_2$ - $\beta_3$ - $\alpha_2$  del dominio *p21ras* de la subunidad  $\alpha_1$  (figura 3-1-1), que encara la base de la gran hélice  $\beta$  de  $G\beta_1$ , interactuando directamente con las hojas  $\beta$  6 y 7 de esta proteína. Casi la longitud entera de la región *switch II* de  $\alpha_1$ , que comprende el loop  $\beta_3$ - $\alpha_2$  y la hélice  $\alpha_2$  (residuos 199-216), está implicada en esta interacción.

La hidrólisis de GTP dispara un cambio conformacional importante en la región *switch II*, que supone un giro de aproximadamente  $120^\circ$  de la hélice  $\alpha$  de esta región. Esta rotación hace que numerosos residuos hidrofóbicos, como *Phe-199* y *Trp-211*, puedan interactuar favorablemente con regiones apolares complementarias de  $G\beta$ . Aunque muchas de las interacciones entre  $\alpha_1$  y  $\beta_1$  son hidrofóbicas, la mencionada rotación de la hélice  $\alpha$  también provoca que se establezcan interacciones iónicas, como la que tiene lugar entre *Glu-216* de  $G\alpha$  y *Lys-57* de  $G\beta$ . Por su parte, el aminoácido *Lys-210* de  $G\alpha$  se inserta en un hueco de considerable carga negativa, constituido por los aminoácidos *Asp-228* y *Asp-246* (Wall et al, 1995).



**Figura 3-1-1. Arquitectura del complejo  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ .** Se muestran dos vistas del complejo ternario de señalización. En ambas, la proteína  $G\alpha_i$  aparece coloreada de azul, la subunidad  $\beta_1$  de verde y la subunidad  $\gamma_2$  de amarillo. La región *switch II* de la proteína  $G\alpha_i$  (residuos 199-216) y la molécula de GDP se han coloreado en rojo (figura adaptada de Wall M.A. et al. (1995) *Cell* **83**: 1047-1058).

En el tránsito del complejo  $\alpha_i$ -GTP $\gamma$ S-Mg<sup>2+</sup> al complejo  $\alpha_i$ -GDP, la región *switch II* sufre un importante desordenamiento (Mixon et al, 1995). Las interacciones que se establecen con  $G\beta_1\gamma_2$  en la constitución del complejo heterotrimérico, suponen el reordenamiento y la consecuente estabilización de esa región. Estos cambios conformacionales dentro de la región *switch II*, ocurren de forma coordinada con cambios en el péptido *switch I* (residuos 178-186), región implicada en la estabilización del heterotrímero unido a GDP.

El *switch I* forma parte del sitio catalítico en el estado en el que  $G\alpha_i$  se halla unida a GTP, pero es expulsado de ese enclave durante el tránsito hacia el complejo  $\alpha_i$ -GDP- $\beta_1\gamma_2$ , de manera que algunos aminoácidos de esa región de  $G\alpha_i$  (*Ile-184* y *Gln-186*) son reorientados para una interacción óptima con  $G\beta_1$ . Al mismo tiempo, otra interacción importante dentro de  $G\alpha_i$  se establece entre *Arg-178* y *Glu-43*, constituyendo una especie de “cinturón de seguridad” dentro de la proteína, que impide la difusión de GDP del sitio catalítico (Wall et al, 1995).

Otra región de  $G\alpha_i$ , crítica en la interacción con el dímero  $G\beta_1\gamma_2$ , corresponde a la hélice  $\alpha$  amino-terminal de la proteína, que se extiende del residuo 12 al 33. Esta parte de la proteína es estabilizada por interacciones favorables con la hélice  $\beta$  de la subunidad  $\beta_1$  (figura 3-1-1). Estos contactos parecen ser cruciales para la formación del

heterotrímico, puesto que la delección del extremo amino de las subunidades  $\alpha$  impide su asociación con  $G\beta\gamma$ .

Por otro lado, en lo que respecta al extremo carboxilo de  $G\alpha_{i1}$ , cabe decir que representa un lugar clave de la proteína para el establecimiento de interacciones con los dominios citoplasmáticos de receptores apropiados (Conklin & Bourne, 1993). Además de actuar como un complejo de señalización “per se”, el dímero  $G\beta\gamma$  mantiene la subunidad  $G\alpha$  en un estado inactivo, unida a GDP, impidiéndole actuar sobre su efector, al interactuar con ella en los mismos sitios que están implicados en la unión  $G\alpha$ -efector.

En relación con la estructura del receptor, las secuencias del segundo y tercer *loop* citoplasmáticos de los receptores heptahelicoidales, son importantes para la selectividad y la afinidad de las interacciones proteína G-receptor. En la proteína  $G\alpha$ , su extremo carboxilo, desordenado en el complejo heterotrimérico y próximo al extremo amino de la proteína, es muy importante en la interacción con el receptor (Conklin & Bourne, 1993). La interacción del receptor con la proteína G heterotrimérica dispara la disociación de GDP de la proteína  $G\alpha$ . La conexión de la región *switch II* con el extremo carboxilo de  $G\alpha$ , y los cambios consecuentes que se producen a raíz del acercamiento del receptor a esa región, podrían explicar el desplazamiento de la molécula de GDP de la proteína G. El receptor, en este caso, podría estar interactuando directamente con la región *switch II*, y no sólo con el extremo carboxilo de  $G\alpha$  (Wall et al, 1995).

### **3.1.1.2. Caracterización estructural de la interacción de la proteína G con los lípidos de la membrana.**

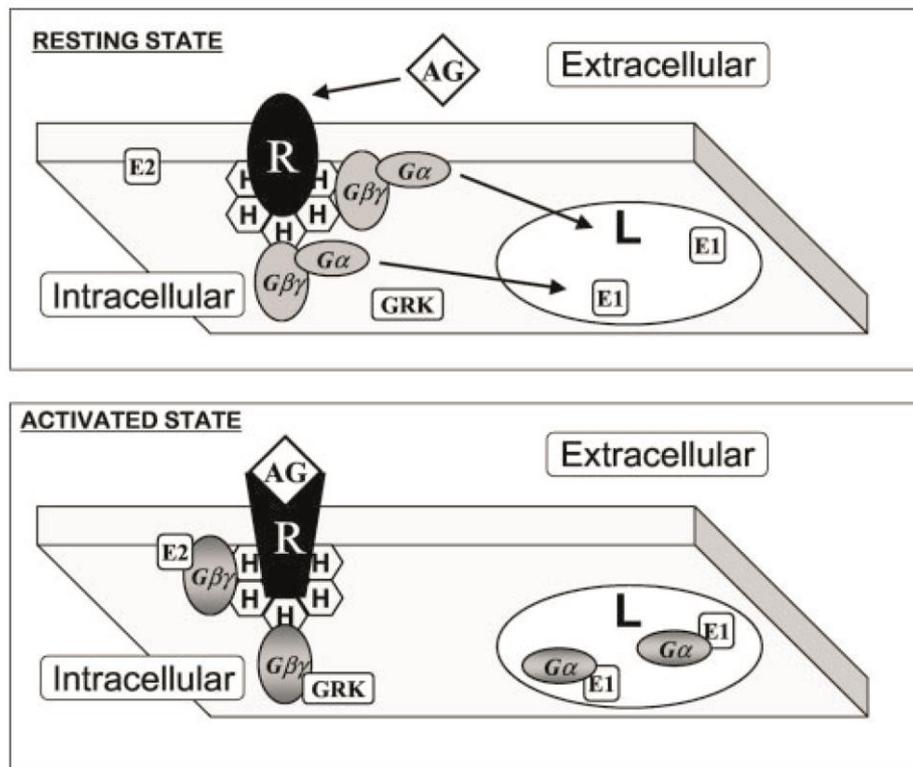
Para poder comprender mejor la influencia que ejercen los lípidos de membrana en los procesos de transducción de señal mediados por proteínas G, conviene tener en cuenta la heterogénea organización de los lípidos en el plano horizontal de la membrana. Cada dominio lipídico que se forma presenta unas propiedades características, que determinan el comportamiento diferencial de los distintos RAPG y proteínas G en su interacción con la bicapa lipídica.

Como consecuencia de la unión de un ligando a su receptor, ocurre un cambio conformacional en el receptor, que se traduce en cambios conformacionales en varias

proteínas G que se hallan en su entorno, produciéndose la activación de las proteínas transductoras. Como resultado de esta activación, tiene lugar la escisión del complejo heterotrimérico en una subunidad  $G\alpha$ , unida a GTP, y un dímero  $G\beta\gamma$ . Estas dos entidades se dirigen entonces hacia sus respectivas proteínas efectoras. El destino de estas proteínas en la superficie de la célula parece estar fuertemente condicionado por la organización estructural que adoptan los lípidos de la membrana, la cual a su vez es función de la morfología lipídica. Así, un lípido con propensión no lamelar como PE, tendente a originar estructuras de tipo  $H_{II}$ , es muy abundante en la hoja interna de la membrana plasmática, influyendo decisivamente en la interacción de proteínas G con la bicapa lipídica (Escribá et al, 2007).

A partir de estudios de interacción de proteínas G con liposomas, se demostró que, tanto las proteínas G heterotriméricas como el dímero  $G\beta\gamma$ , muestran una unión preferencial a membranas con alto contenido en PE y, por tanto, con alta propensión a constituir fases no lamelares de tipo  $H_{II}$  (figura 3-1-2). En cambio, la subunidad  $G\alpha_i$  muestra preferencia por membranas de tipo lamelar, con un alto contenido en PC (Vögler et al, 2004). Este comportamiento divergente de las proteínas G estudiadas parece estar también condicionado por el tipo de modificación lipídica que portan, hecho que condicionaría la presencia de un tipo concreto de proteína G en unos u otros dominios de membrana (Melkonian et al, 1999; Moffett et al, 2000; Vögler et al, 2004).

De esta manera, RAPG y proteínas G se reparten entre los distintos dominios de la membrana, cada uno de ellos con una organización estructural concreta, lo que promueve la interacción rápida y específica entre proteína transductora y proteína efectora en una localización concreta de esa membrana. De este modo, además, se evitan interferencias entre distintas rutas de señalización. Así, por ejemplo, en cardiomiocitos, el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico y  $G\alpha_{i1}$  se encuentran en caveolas, mientras que receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos y  $G\alpha_s$  están presentes predominantemente en regiones no caveolares de la membrana plasmática (Rybin et al, 2000). En células epiteliales y endoteliales de tejido pulmonar,  $G\alpha_i$  y  $G\alpha_s$  se localizan en “lipid rafts”, mientras que  $G\alpha_q$  se encuentra en caveolas (Oh & Schnitzer, 2001).



**Figura 3-1-2. Modelo explicativo de la influencia de la estructura de la membrana en la señalización asociada a RAPG.** En el panel superior, se representa el estado de reposo de la maquinaria de señalización, de manera que receptor (R) y proteína G heterotrimérica convergen en zonas de membrana con estructura no lamelar de tipo hexagonal (H). En el panel inferior, se muestra como la unión del agonista (AG) al receptor provoca un cambio a un estado activo del sistema de señalización, de manera que una molécula de receptor es capaz de activar varias proteínas G. Así, las subunidades  $G\alpha$  se disocian de los dímeros  $G\beta\gamma$  y las primeras se dirigen hacia regiones lamelares de la membrana plasmática (L), donde actuarían sobre sus proteínas efectoras. En cambio, los dímeros  $G\beta\gamma$  tienen preferencia por regiones no lamelares de la membrana, actuando allí sobre sus respectivos efectores, entre ellos la proteína GRK (figura adaptada de Vögler, O. et al. (2004) *J Biol Chem*, **279**: 36540-36545).

La alta afinidad del dímero  $G\beta\gamma$  y de la proteína G heterotrimérica por regiones de membrana tendientes a adoptar una estructura no lamelar (figura 3-1-2), parece poner de manifiesto el papel director del dímero  $G\beta\gamma$  en el marco de la interacción lípido-proteínas G heterotriméricas (Vögler et al, 2004).

La localización diferencial de proteínas G en la membrana está influenciada por los lípidos que portan y por el grado de empaquetamiento lipídico existente en su entorno. Los grupos isoprenoides de las proteínas  $G\gamma$  encajan mejor en un ambiente lipídico con una presión lateral superficial más reducida, donde los lípidos de la membrana no se hallan densamente empaquetados, sino que presentan una distribución más bien laxa. En cambio, los ácidos palmítico y mirístico de las subunidades  $G\alpha$  se asientan mejor en

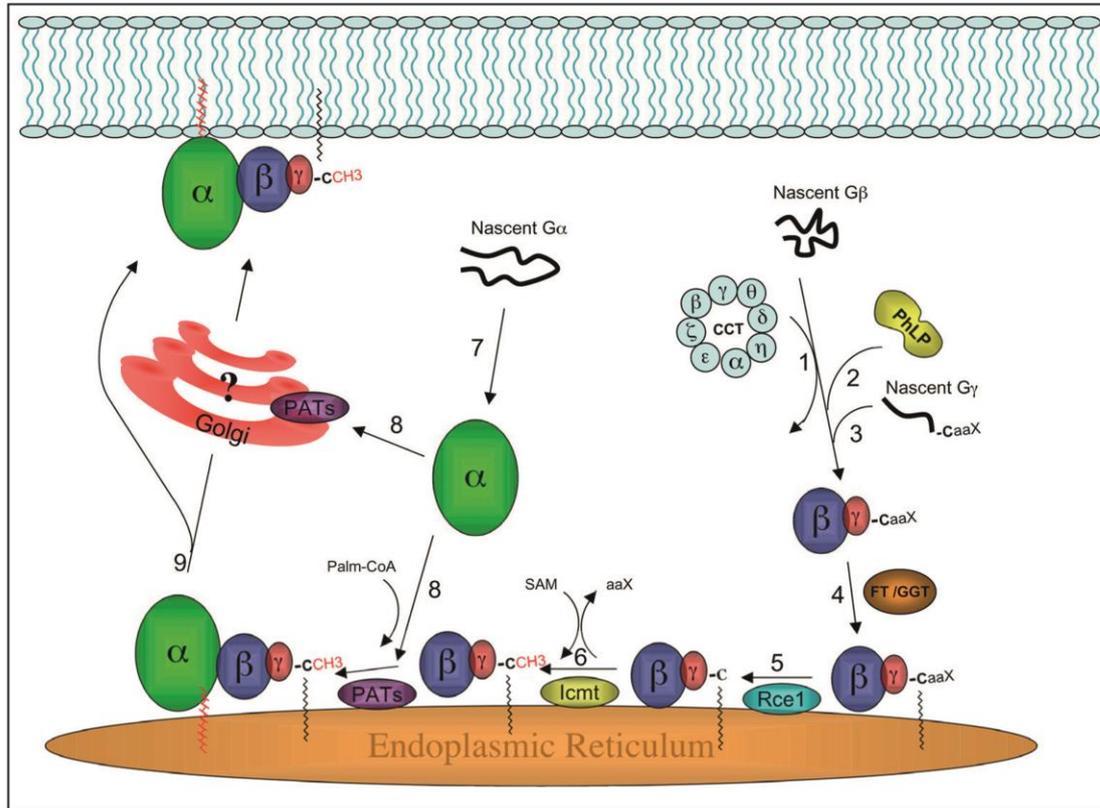
regiones de membrana menos flexibles, con un mayor grado de empaquetamiento lipídico, como los dominios de tipo  $L_o$ .

También las cargas de los lípidos de la membrana juegan un papel importante en la localización de proteínas G y RAPG en la membrana. Las interacciones electrostáticas que se establecen entre la carga negativa de lípidos como la PS, y los parches de cargas positivas del dominio amino-terminal de  $G\alpha$  y del extremo carboxilo de  $G\gamma$ , estarían influyendo de manera importante en este contexto (Kosloff et al, 2002; Hessel et al, 2003; Pedone & Hepler, 2007).

Las proteínas G son también capaces de modular la estructura y la organización de los lípidos de membrana. Así, por ejemplo, los grupos farnesilo y geranylgeraniol de las distintas subunidades  $G\gamma$ , junto con sus 12 aminoácidos carboxi-terminales, generan microdominios con tendencia a constituir estructuras de tipo  $H_{II}$  y enriquecidos en este péptido, el cual actúa cooperativamente con los lípidos pro-no lamelares que puedan existir en esa región (Escribá, 2006; Barceló et al, 2007).

### **3.1.2. Tráfico subcelular de las proteínas G heterotriméricas.**

Se ha comprobado que el tipo de modificación lipídica, o su combinación en una determinada proteína G, en un momento dado, influye decisivamente en su destino dentro de la célula. En este sentido, la ausencia de componentes lipídicos conduce a la deslocalización de proteínas G dentro de la célula, lejos de su ubicación natural en la membrana plasmática (Morales et al, 1998; Fishburn et al, 1999; Michaelson et al, 2002; Rocks et al, 2010).



**Figura 3-1-3. Modelo de ensamblaje y tráfico de proteínas G a la membrana plasmática.** Los distintos pasos que contempla el modelo aparecen representados en la ilustración. 1) El complejo de chaperones CCT se une a la proteína G $\beta$  recién sintetizada y promueve su correcto plegamiento. 2) PhLP1 se une a CCT-G $\beta$  y posterior fosforilación de PhLP1 estimula la liberación de PhLP1-G $\beta$ . 3) G $\gamma$  recién sintetizada se incorpora al complejo PhLP1-G $\beta$ . En algún momento el complejo G $\beta\gamma$  se disocia de PhLP1. 4) G $\gamma$  es farnesilada o geranilgeranilada por una farnesil-transferasa (FT) o geranilgeranil-transferasa (GGT) citoplasmáticas, y el heterodímero G $\beta\gamma$  se dirige hacia la superficie citosólica del retículo endoplasmático. 5) Una proteasa del RE, denominada RCE, digiere los tres aminoácidos carboxi-terminales de la proteína G $\gamma$  isoprenilada. 6) A continuación, el enzima Icmt cataliza la incorporación de un grupo metilo en el nuevo extremo carboxilo de la proteína G $\gamma$ . 7) De un modo similar a lo que ocurre con G $\beta$ , es probable que uno o varios chaperones participen en el plegamiento adecuado de la proteína G $\alpha$ . 8) No se conocen los lugares exactos de encuentro y acoplamiento entre G $\alpha$  y G $\beta\gamma$ , y de palmitoilación de la proteína G $\alpha$ . Según este modelo, la formación del heterotrímero y la palmitoilación de G $\alpha$  ocurrirían en el RE. 9) Finalmente, el heterotrímero, recientemente formado, se movería desde una localización intracelular hasta la membrana plasmática. Tampoco está claro si la vía a través de la cual ocurre este tránsito es dependiente o independiente del Golgi (figura adaptada de Marrari, Y. et al. (2007) *Biochemistry*, **46**: 7665-7677).

En el modelo de dos señales propuesto por diversos autores, el dímero G $\beta\gamma$  jugaría un papel determinante en el destino del complejo heterotrímérico (figura 3-1-3), ya que su ausencia (Fishburn et al, 1999), o su alteración (Fishburn et al, 2000), provoca que la proteína G $\alpha$  se localice menos unida a la membrana plasmática. Además, el dímero G $\beta\gamma$  parece conferir una mayor estabilidad a la proteína G $\alpha$  en su interacción con una proteína con actividad palmitoil-acil-transferasa (PAT), condicionando de ese modo la eficacia en la incorporación de ácido palmítico a la proteína G $\alpha$  (Dunphy et al, 1996, Rocks et al, 2010).

El ácido palmítico es, en este modelo, una segunda señal clave. La mayoría de proteínas  $G\alpha$ , exceptuando las proteínas  $G\alpha_{t1}$ ,  $G\alpha_{t2}$  y  $G\alpha_{gus}$ , son palmitoiladas en su extremo amino-terminal (Aicart-Ramos et al, 2011). La ausencia de palmitoilación en esas proteínas también afecta drásticamente a su localización en la célula (Fishburn et al, 1999; Michaelson et al, 2002, Bijlmakers & Marsh, 2003; Rocks et al, 2010). Así, parece claro que la formación del heterotrímero y la palmitoilación de la proteína  $G\alpha$  son procesos concertados (Evanko et al, 2000), ambos esenciales para el correcto tránsito de las proteínas  $G\alpha$  hacia la membrana plasmática (Marrari et al, 2007, Rocks et al, 2010).

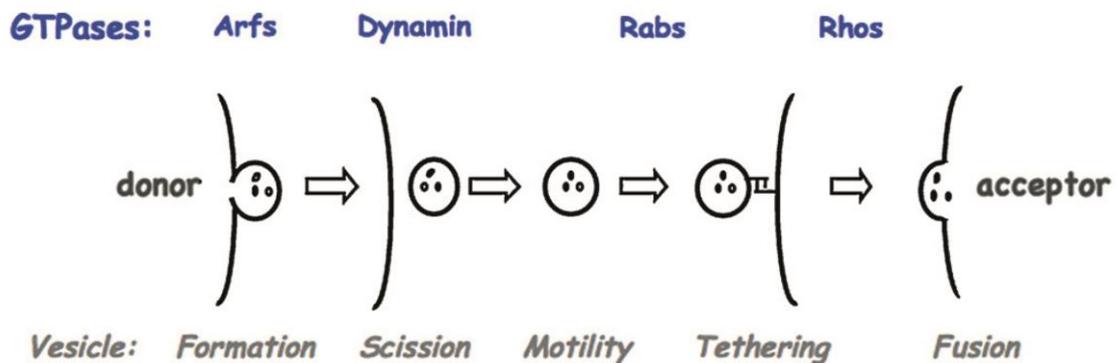
No está claro el camino exacto que siguen los distintos complejos heterotriméricos por el interior de la célula, desde su lugar de síntesis hasta su destino final en la membrana plasmática; ni tampoco el lugar exacto donde ocurre el acoplamiento de las distintas subunidades constitutivas del complejo (figura 3-1-3) (Bijlmakers & Marsh, 2003; Marrari et al, 2007). Cada vez se hace más evidente, sin embargo, que no existe una única ruta que conduzca proteínas de membrana periféricas hacia la superficie de la célula. Una pista acerca de cómo podría ser ese transporte en el caso de las proteínas  $G$  heterotriméricas, podría aportarla, una vez más, el ácido palmítico unido a la proteína  $G\alpha$ .

Se le ha atribuido al ácido palmítico la función adicional de influir, de una manera más precisa, en la localización de proteínas  $G\alpha$  dentro de las membranas biológicas. Más concretamente, la palmitoilación de la proteína la conduciría hacia regiones o dominios dotados de un mayor orden estructural, con una composición lipídica y proteica concretas (Huang et al, 1997; Galbiati et al, 1999). En este punto es donde la hipótesis de “raft”, y más concretamente su posible papel en el tráfico de proteínas hacia la membrana (Simons & van Meer, 1988), converge con la cuestión específica del tránsito de proteínas  $G$  por la célula. Así, algunas proteínas  $G\alpha$  tienen en su extremo amino-terminal un motivo *Met-Gly-Cys*, que se ha asociado a preferencia de la proteína por dominios de tipo “raft” (Melkonian et al, 1999; Moffett et al, 2000). Este tipo de proteínas pueden hallarse en algún momento doblemente aciladas por cadenas de ácidos grasos saturados, lo que determinaría su partición preferencial dentro de dominios de tipo “raft” (Simons & Ikonen, 1997). Esto podría implicar un transporte de proteínas  $G$  a través de la ruta exocítica desde la red *trans* del aparato de Golgi a la membrana plasmática (Michaelson et al, 2002; Marrari et al, 2007).

Sin embargo, algunas proteínas  $G\alpha$  con esas características no parecen encajar dentro de ese marco conceptual; y seguirían una ruta independiente del transporte vesicular, aprovechando la afinidad limitada por membranas que le confiere el grupo miristoilo (Fishburn et al, 1999; Bijlmakers & Marsh, 2003; Rocks et al, 2010). Según este modelo, el ácido mirístico actuaría como un anclaje hidrofóbico inespecífico, que le permitiría a la proteína  $G\alpha$  interactuar con diferentes tipos de membranas de la célula. En un momento dado, alcanzaría la membrana plasmática, donde la palmitoilación enzimática de esa proteína haría que se quedara ahí retenida de un modo permanente. Con la llegada de la proteína  $G\alpha$  miristoilada a la membrana plasmática, podría tener lugar el encuentro de esa proteína con el complejo  $G\beta\gamma$ , lo cual supondría una unión más estable y duradera de todo el complejo a la membrana (Fishburn et al, 1999).

### Mecanismos responsables del tráfico vesicular en la célula.

Hoy día, se conoce bien la maquinaria enzimática implicada en el tráfico vesicular, constituida por proteínas de la superfamilia *Rab*, dentro del grupo de proteínas de unión a nucleótidos de guanina o proteínas G. Todas las proteínas de esta superfamilia tienen un dominio GTPasa y la mayoría de ellas portan uno o dos grupos lipídicos que permiten su interacción con las membranas biológicas (Itzen & Goody, 2011; Segev, 2011). Así, las pequeñas GTPasas se han erigido en reguladores clave del transporte vesicular, con diferentes familias proteicas gobernando los diferentes pasos de ese complejo proceso, tal y como aparece representado en el diagrama de la figura 3-1-4 (Segev, 2011).



**Figura 3-1-4. Familias de pequeñas GTPasas que regulan los distintos pasos del transporte vesicular.** La familia de proteínas *Arf* controla el proceso de formación de una vesícula y la *dinamina*, la escisión de la misma. La motilidad vesicular es regulada por proteínas *Rab*. Éstas últimas también intervienen en el anclaje de la vesícula a la membrana de destino, así como las proteínas *Rho*. La fusión de la vesícula con la membrana aceptora es mediada por proteínas *Rho* (figura adaptada de Segev, N. (2011) *Sem Cell Dev Biol*, **22**: 1-2).

Otras proteínas de reciente descubrimiento implicadas directamente en el transporte vesicular son las *golginas*. Como su nombre indica, se hallan localizadas por todo el complejo del Golgi, asociadas con el lado citoplasmático de las membranas. Presentan abundantes y extensas regiones con estructura enrollada, que pueden llegar a adentrarse considerablemente en el citoplasma, promoviendo la captura y anclaje de vesículas de transporte a la membrana del Golgi antes de la fusión (Goud & Gleeson, 2010). Investigaciones posteriores han revelado la importancia clave de estas proteínas no sólo en los procesos de transporte vesicular, sino en el mantenimiento de la integridad estructural del complejo del Golgi al completo (Goud & Gleeson, 2010).

Aunque numerosos modelos contemplan la activación de las pequeñas GTPasas, y su consiguiente interacción con efectores, con el fin de poder explicar convenientemente el tráfico vesicular; la cuestión parece quedar incompleta sin la consideración de determinantes adicionales de tipo lipídico. Así, se ha visto que lípidos como el fosfatidilinositol 4-fosfato (PIP) y el diacilglicerol (DAG) interaccionan específicamente, en el aparato de Golgi, con proteínas implicadas en los procesos de transporte de membranas, tanto de entrada como de salida del Golgi (Munro, 2005).

Otro lípido que empieza a considerarse en modelos explicativos cada vez más completos sobre la organización del aparato de Golgi, es el ácido palmítico. Esta vez se contempla desde una perspectiva más amplia, ya no sólo en relación con el movimiento de proteínas G por la célula, sino en alusión a las bases mismas de otros fenómenos biológicos de gran complejidad, como son el tráfico vesicular y la definición estructural del aparato de Golgi (Munro, 2005). Un avance importante ha sido el hallazgo, en esta región de la célula, de enzimas responsables de la palmitoilación de proteínas. Esto vino a confirmar el importante papel que esa reacción lipídica tiene en el aparato de Golgi, como detonante del reclutamiento de muy diversas proteínas a ese nivel (Munro, 2005).

En síntesis, se hace cada vez más evidente la necesidad de abordar el estudio de fenómenos biológicos que tienen lugar en membranas a la luz de modelos más completos. Ya no se trata de reflejar cómo las nuevas proteínas que se van descubriendo se organizan entre sí, sino de contemplar la organización lipídica de las membranas biológicas y cómo esa organización afecta a las interacciones que los lípidos establecen con esas proteínas, y a la interacción entre ellas mismas. Y a la inversa, considerando también el efecto de las proteínas sobre la organización lipídica.

### **3.1.3. Estructura de los Receptores Acoplados a Proteínas G (RAPG).**

#### **Caracterización estructural de las interacciones dentro del receptor y de las interacciones entre el receptor y el ligando.**

Los RAPG son un componente fundamental del sistema de transducción de señales a través de proteínas G. Su participación es necesaria en el ciclo de activación e inactivación de proteínas G. Se trata de proteínas integrales de membrana, que captan información procedente del exterior de la célula, la cual transmiten hacia el interior mediante la activación de las proteínas G, con las que interaccionan, y la posterior generación de un segundo mensajero. Su enorme diversidad y su decisivo papel en el contexto de la señalización celular, hace necesaria una caracterización más detallada de estas moléculas.

Las regiones con mayor grado de homología entre distintos RAPG corresponden a los segmentos que atraviesan la membrana, mientras que la mayor diversidad se localiza en el extremo amino-terminal de la proteína. La longitud de esta región es muy variable, siendo relativamente corta (10-50 aminoácidos) en el caso de receptores peptídicos, y mucho más grande en el caso de receptores para hormonas glicoproteicas y de la familia del glutamato (Kobilka, 2007).

A diferencia de la similaridad estructural y funcional característica de los RAPG, está la diversidad estructural de sus ligandos naturales. Así, éstos abarcan un amplísimo rango de tamaños, que va desde el nivel de partícula subatómica (fotones), hasta el de péptidos y proteínas. Muchos de esos ligandos interaccionan con el receptor uniéndose al interior de los segmentos transmembrana, mientras que hormonas peptídicas y proteínas, con frecuencia, se unen al extremo amino y a los “loops” extracelulares del receptor (Kobilka, 2007).

En la década de los ochenta se consiguió por primera vez clonar, secuenciar y expresar genes codificantes de RAPG, lo que supuso un gran avance en la caracterización de sus propiedades estructurales y funcionales (Kobilka et al, 1987). Ya en la década de los noventa, se llevó a cabo una caracterización estructural detallada de estos receptores, utilizando como modelo la rodopsina, en su forma inactiva. Entonces, se pudieron

obtener los primeros cristales bidimensionales de la rodopsina, los cuales proporcionaron el primer dibujo acerca de la orientación de los siete segmentos transmembrana en un entorno lipídico. Se observó que cuatro de las siete hélices transmembrana se orientaban perpendicularmente a la superficie de la membrana (Schertler et al, 1993).

A partir de los trabajos del grupo de Gebhard Schertler, se sentaron las bases para posteriores estudios estructurales con otros RAPG. Dos tipos de cristales tridimensionales diferentes de la rodopsina, de alta resolución, fueron posteriormente obtenidos. La diferencia más notable entre ellos corresponde al “loop” intracelular que conecta los segmentos transmembrana 5 y 6, el cual está implicado en el acoplamiento de la proteína G al receptor (Kobilka, 2007).

Muchos de los giros que conectan dos hélices transmembrana en los RAPG son estables estructuralmente cuando son separados del resto de la proteína. Esto ha permitido caracterizar bien la estructura de esas regiones por medio de la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) (Yeagle & Albert, 2007). El desarrollo de estos trabajos ha supuesto la aportación de valiosa información acerca de la organización estructural de las caras extracelular e intracelular de diversos RAPG.

A partir de estos estudios de RMN de alta resolución, se comprobó que las hélices  $\alpha$  transmembrana de RAPG son intrínsecamente estables en su estructura secundaria helicoidal; y que, tanto la estabilidad de estas estructuras, como la estabilidad intrínseca de los “loops”, son un punto clave en la estabilidad global del receptor.

Otro punto fundamental es la estabilidad derivada de las interacciones hélice – hélice. Se ha comprobado que estas interacciones existen y que son fuertes y específicas. Por tanto, esas interacciones constituyen otro componente clave en la estabilidad global del receptor, influyendo decisivamente en su correcto plegamiento y en su funcionalidad (Yeagle & Albert, 2007).

Una ventaja importante que ofrecían los estudios con cristales proteicos bidimensionales consistía en que la estructura del receptor obtenida reflejaba la influencia de los lípidos de la membrana sobre dicha estructura. La principal desventaja de estos estudios era la baja resolución que caracterizaba los mapas bi y tridimensionales resultantes. Una mejora sustancial en la resolución de los cristales bidimensionales, permitió conocer de forma precisa la orientación de la rodopsina bovina inactiva respecto a la membrana. Con los cristales tridimensionales de rodopsina, se pudo obtener una información mucho más detallada sobre la disposición

de cada uno de sus aminoácidos y de su ligando, denominado retinal (Yeagle & Albert, 2007).

Estudios de RMN han proporcionado importantes hallazgos acerca de la fotoquímica del retinal. El *11-cis retinal* fotoisomeriza a *todo-trans retinal* tras absorber un fotón de luz. En un modo que aún no se conoce en detalle, esa isomerización se transmite a la rodopsina, de modo que la conformación de la cara citoplasmática del RAPG cambia de modo significativo y esto conduce a la unión del complejo Gt al receptor. En los cristales tridimensionales de la rodopsina inactiva, el retinal se halla unido a *Lys-248* en la séptima hélice transmembrana, y se extiende a través del haz de siete hélices transmembrana, en un plano aproximadamente paralelo al de la superficie de la membrana. Otros aminoácidos con los que interactúa el retinal en un estado inactivo de la proteína son *Trp-265* y *Glu-113* (Yeagle & Albert, 2007).

Como consecuencia de la excitación por la luz, la rodopsina cicla a través de una serie de intermedios espectrales, que producen *meta-rodopsina I*. La *meta-rodopsina I* es un intermediario en el proceso de activación de la rodopsina, que ocurre después de la fotoisomerización del *11-cis retinal*, pero antes de los cambios estructurales requeridos para la activación de la rodopsina. Durante esta fase, apenas hay cambios en la estructura de la proteína; y sí en la del retinal. Con el paso de *meta-rodopsina I* a *meta-rodopsina II*, se produce la activación del receptor, de modo que el receptor es capaz de unirse a la proteína G y activarla. En este paso, los cambios conformacionales que ocurren en el retinal constituyen el detonante energético. En el tránsito hacia *meta-rodopsina II*, el retinal se desplaza dentro del haz helicoidal en la dirección del segmento transmembrana cinco, estableciéndose nuevas interacciones. Además, se ha visto que con la activación del receptor, el anillo del retinal es capaz de interactuar con la hélice cuatro de la rodopsina (Yeagle & Albert, 2007).

Más cambios conformacionales, que ocurren en la transición hacia el estado de *meta-rodopsina II*, afectan al ordenamiento de las distintas hélices  $\alpha$  del receptor. Así, la hélice correspondiente al segundo segmento transmembrana se mueve respecto a la peculiar octava hélice, como también lo hace la hélice del sexto segmento transmembrana. Los segmentos transmembrana primero y séptimo se disponen más separados entre sí.

La hélice ocho, hallada en la región carboxi-terminal de la rodopsina, es dependiente de membranas: existe como tal en presencia de membranas, pero esta estructura desaparece en su ausencia. El contenido en fosfatidilserina de la membrana es clave en

la estabilización de la forma helical (Krishna et al, 2002; Yeagle & Albert, 2007). En el extremo carboxilo de esa hélice se hallan los sitios de palmitoilación del receptor.

Un cambio crucial que ocurre en la superficie citoplasmática del receptor en el estado de *meta-rodopsina II*, es la apertura de una hendidura como consecuencia de la ruptura del cierre iónico entre *Arg-135*, formando parte de la hélice tres, y *Glu-247*, en el extremo citoplasmático de la hélice seis. Esta interacción estabiliza el estado basal del receptor y debe romperse para formar el estado excitado.

Poco se sabe sobre la estructura de otros RAPG en su estado activo. Cambios estructurales importantes en el tercer “loop” intracelular ocurren con la activación del receptor canabinoide CB1. En el caso del receptor de la angiotensina II, se vio que una prolina en la hélice tres es necesaria para la transición al estado activo del receptor. Además, hay un cambio en la interacción entre el segundo segmento transmembrana y el séptimo.

A diferencia del *trans-retinal* unido covalentemente a la rodopsina, el *trans-retinal* libre no es un agonista muy efectivo para la opsina (la variante sin ligando de la rodopsina). Para la gran mayoría de los restantes RAPG, la activación ocurre cuando un agonista difunde hacia un receptor sin ligando alguno unido. En ausencia de ligandos, el nivel de actividad basal del receptor viene dado por un equilibrio entre las formas activas e inactivas del receptor. Los agonistas completos interaccionan con el estado activo del receptor, estabilizándolo. Mientras que los agonistas inversos, estabilizan el estado inactivo del mismo. La *eficacia* de los ligandos refleja su capacidad para alterar el equilibrio entre estos dos estados (Kobilka, 2007).

En el estado inactivo sin ligando de un RAPG, el ordenamiento de los segmentos transmembrana es estabilizado por interacciones no covalentes entre las cadenas laterales de los aminoácidos. Ligandos estructuralmente distintos son capaces de romper diferentes combinaciones de las interacciones estabilizadoras del estado basal, bien directamente por unión a aminoácidos que están implicados en estas interacciones intramoleculares; o indirectamente, estabilizando nuevas interacciones intramoleculares. La *afinidad* de un ligando particular por un receptor depende de los costes y beneficios energéticos asociados con las interacciones rotas y creadas, mientras que la *eficacia* del ligando depende de la capacidad para disparar los “switches” asociados con la activación (Kobilka, 2007).

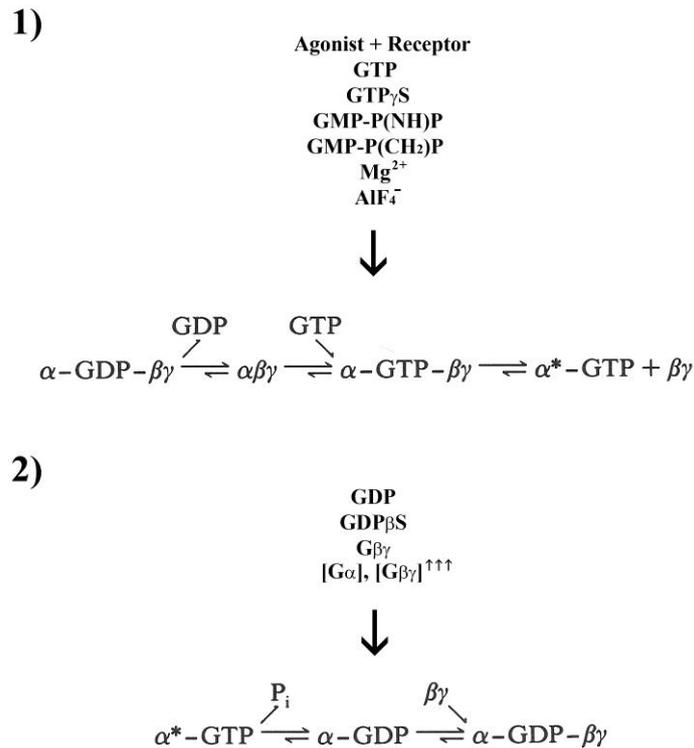
## 3.2. RESULTADOS

El objetivo de esta parte de la tesis consistió en determinar la relación estructura-función de las subunidades  $G\alpha_1$  (región N-terminal) y  $G\gamma_2$  (región C-terminal), en la interacción del complejo heterotrimérico geranilado  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$  con membranas lipídicas. Además, como en los dos capítulos anteriores, se estudió el efecto de distintos lípidos naturales representativos de la heterogeneidad estructural de las membranas biológicas, en la unión de los diferentes complejos heterotriméricos (nativo y mutantes de  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ ) purificados a membranas modelo.

### 3.2.1. Reconstitución, caracterización lipídica y purificación de complejos heterotriméricos $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ .

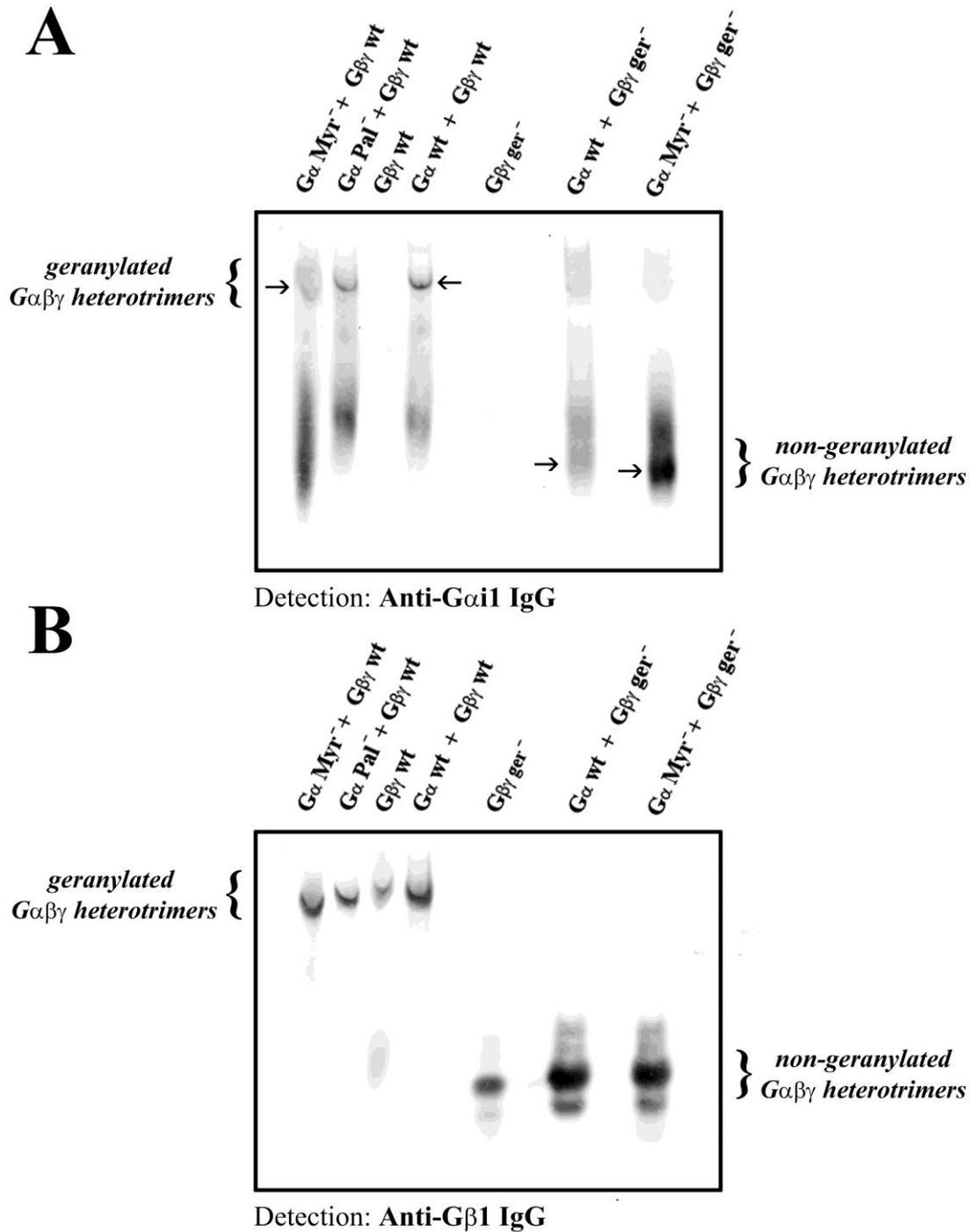
Las especies  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , purificadas por separado, se combinaron con la idea de reconstituir el complejo heterotrimérico  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ . Para ello, se emplearon unas condiciones que favorecieron el acoplamiento de esas dos entidades fundamentales que constituyen el heterotrímero. Así, se empleó un análogo del nucleótido GDP, el  $GDP\beta S$ , capaz de unirse irreversiblemente a la subunidad  $G\alpha$ , de manera que la conformación de esta proteína fuera la más favorable para la interacción con el dímero  $G\beta\gamma$ . Tal y como indica la figura 3-2-1, en la que se muestra la secuencia de reacciones conducentes a la formación del heterotrímero,  $GDP\beta S$  favorece la transición hacia la obtención del complejo ternario. La ausencia de modificaciones lipídicas en las proteínas  $G\alpha$  y  $G\gamma$  es un factor desestabilizador que dificulta el acoplamiento. Para contrarrestar este efecto, algunos autores consideraron la utilización de altas concentraciones de GDP,  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  (Wall et al, 1995; Gautam et al, 1998). Así, la muestra con  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  fue liofilizada y llevada hasta un volumen de reacción que permitió concentrar en alto grado los sustratos de la reacción. Además, se utilizó una concentración alta de  $GDP\beta S$ , de 5 mM.

Se sabe que las subunidades  $\beta\gamma$ , además de promover *per se* el acoplamiento entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ , estabilizan la unión de GDP a la subunidad  $\alpha$ , inhibiendo así la liberación de GDP (Iyengar & Birnbaumer, 1990). Por ello, fueron añadidos a la mezcla de reacción 1,5 moles de  $G\beta\gamma$  por cada mol de  $G\alpha$ .



**Figura 3-2-1. Secuencias de reacción que describen el ciclo básico de activación y desactivación de proteínas G.** En 1) se detalla la secuencia de eventos que llevan a la disociación del complejo heterotrimérico y la activación de la proteína  $G\alpha$ . Además, se indican los factores que promueven esta disociación. En 2) se representa la secuencia de eventos que conducen a la formación del complejo  $G\alpha\beta\gamma$ , unido a GDP. En este caso, se indican los factores que promueven la asociación entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  (figura adaptada y modificada de Iyengar & Birnbaumer (1990) *G proteins*, p. 152. San Diego, California).

Tras el proceso de liofilización y de reconstitución de la muestra en presencia de  $\text{GDP}\beta\text{S}$  a alta concentración, se analizó el posible acoplamiento entre  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$  mediante *western-blot* no desnaturizante (figura 3-2-2). Hay una notable diferencia de movilidad electroforética entre los dímeros  $G\beta\gamma$  *WT* y  $G\beta\gamma$  *ger*<sup>-</sup> (figura 3-2-2 B), de acuerdo con el resultado de la figura 2-2-5. Hubo una correspondencia entre la localización de las bandas más intensas correspondientes a proteínas  $G\alpha$  (figura 3-2-2 A), detectadas con el anticuerpo anti- $G\alpha$ , y la localización de las bandas correspondientes a proteína  $G\beta_1$  (figura 3-2-2 B), allí donde se cargaron muestras con los tres constituyentes del complejo  $G\alpha\beta\gamma$ . Este último resultado demuestra la consecución de complejos heterotriméricos en todos los casos ensayados. Más aún, el patrón de movilidad del dímero  $G\beta\gamma$  en el gel no desnaturizante condicionó el perfil migratorio de la proteína  $G\alpha$  asociada, y no a la inversa. Hubo, por tanto, una mayor influencia del dímero  $G\beta\gamma$  en las propiedades electroforéticas del complejo heterotrimérico. También se hará patente una mayor influencia del dímero en el estudio de las interacciones  $G\alpha\beta\gamma$ -membranas modelo.



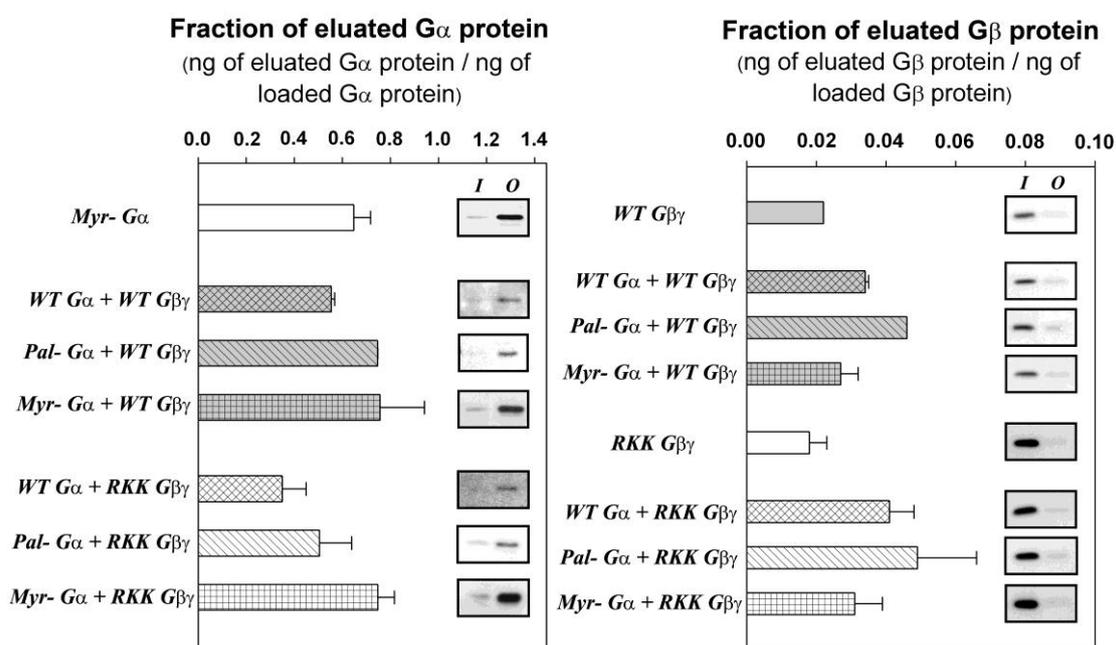
**Figura 3-2-2.** “Inmunoblots” obtenidos bajo condiciones no desnaturalizantes. *A*, inmunoblot correspondiente a heterotrimeros  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$  purificados y liofilizados detectados con un anticuerpo anti- $G\alpha_i$ . Las flechas indican la posición en el gel de la proteína  $G\alpha_i$  formando parte de  $G\alpha\beta\gamma$ . *B*, inmunoblot con idéntico perfil de muestras, pero correspondiente a otro gel electroforético. La detección se hizo con un anticuerpo anti- $G\beta_1$

Una banda muy intensa correspondiente a la proteína  $G\alpha_i^{Myr^-}$ , en presencia del dímero  $G\beta\gamma^{ger^-}$ , fue visualizada en el gel revelado con el anticuerpo anti- $G\alpha$  (figura 3-2-2 A). La ubicación de esta banda se correspondió con la perteneciente a la proteína

Gβ<sub>1</sub> en el otro gel (figura 3-2-2 B). Así pues, las condiciones de reacción arriba mencionadas posibilitaron el acoplamiento entre una proteína Gα sin modificaciones lipídicas y un dímero Gβγ sin el resto isoprenoide, la asociación que en teoría era más difícil de conseguir de entre todas las combinaciones ensayadas.

Se aprovechó la misma matriz cromatográfica empleada en la purificación de Gα y Gβγ para llevar a cabo una purificación por afinidad del complejo Gαβγ, lo que permitió enriquecer la muestra en heterotrímero y descartar, así, la mayor parte del dímero Gβγ no unido a Gα (figura 3-2-3).

### *Recovery of Gαβγ heterotrimer by affinity chromatography*



**Figura 3-2-3. Purificación por cromatografía de afinidad de diferentes complejos heterotrímicos Gαβγ.** *Izquierda*, perfil de elución de proteínas Gα<sub>i1</sub> WT, Gα<sub>i1</sub> Pal<sup>-</sup> y Gα<sub>i1</sub> Myr<sup>-</sup> incubadas, por un lado, con el dímero Gβγ WT, y por otro lado, con el dímero Gβγ RKK, en una matriz constituida por agarosa y níquel. *Derecha*, perfil de elución de proteína Gβ formando parte de los dímeros Gβγ WT y Gβγ RKK, tras incubación de cada uno de esos dímeros en presencia de las proteínas Gα<sub>i1</sub> WT, Gα<sub>i1</sub> Pal<sup>-</sup> y Gα<sub>i1</sub> Myr<sup>-</sup>, en el mismo tipo de matriz indicado anteriormente. Ambos gráficos van acompañados de inmunoblots representativos de la cantidad de proteína G cargada en la matriz (Gα a la izquierda y Gβγ a la derecha), fracción denominada “I” (input); y de la cantidad de la correspondiente proteína G eluida con imidazol, fracción “O” (output).

Una posterior filtración de la muestra en columnas de concentración permitió separar el complejo heterotrímico del monómero Gα y el dímero Gβγ residual, quedando un concentrado de Gαβγ en la parte superior de la columna. De este modo, se obtuvieron

diferentes complejos  $G\alpha\beta\gamma$ , reconstituídos y purificados, que fueron utilizados en estudios de unión a membranas modelo.

### 3.2.2. Interacciones de complejos $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ con membranas modelo.

De los 64 posibles heterotrímeros que se podrían formar con las construcciones realizadas, los complejos  $G\alpha\beta\gamma$  geranylgeranilados purificados que se utilizaron en los estudios de unión a diferentes membranas modelo fueron:

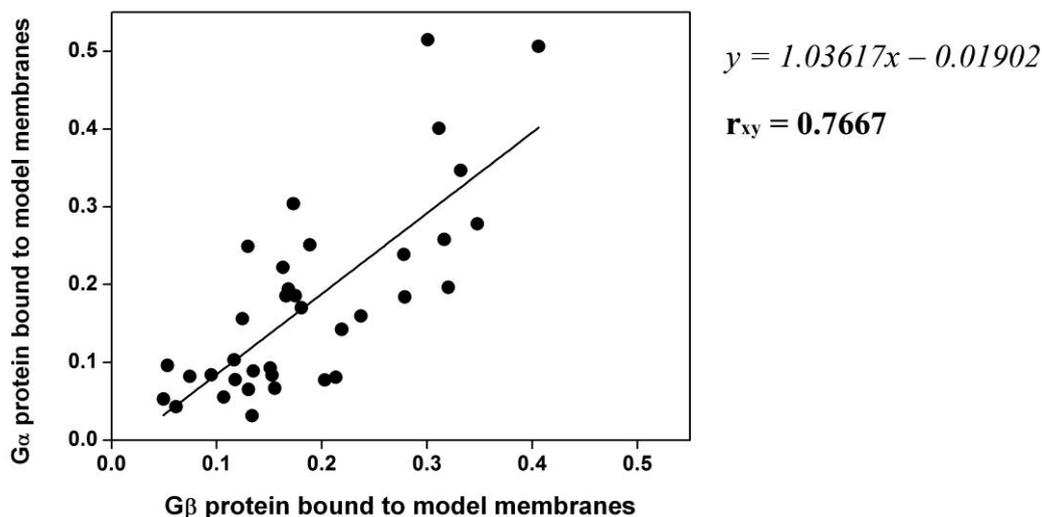
- i)  $G\alpha\text{ PAL}^+ + G\beta\gamma\text{ WT}$ , sin mutaciones, y con la subunidad  $G\alpha_i$  palmitoilada.
- ii)  $G\alpha\text{ PAL}^- + G\beta\gamma\text{ WT}$ , con mutación en la cisteína N-terminal de  $G\alpha_i$  ( $\text{Cys-3} \rightarrow \text{Ser-3}$ ).
- iii)  $G\alpha\text{ MYR}^- + G\beta\gamma\text{ WT}$ , con mutación en la glicina N-terminal de  $G\alpha_i$  ( $\text{Gly-2} \rightarrow \text{Ala-2}$ ).
- iv)  $G\alpha\text{ PAL}^+ + G\beta\gamma\text{ RKK}$ , con mutaciones en los aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$  ( $\text{Arg-62} \rightarrow \text{Gly-62}$ ,  $\text{Lys-64} \rightarrow \text{Gly-64}$ ,  $\text{Lys-65} \rightarrow \text{Gly-65}$ ).
- v)  $G\alpha\text{ PAL}^- + G\beta\gamma\text{ RKK}$ , con mutaciones en la cisteína N-terminal de  $G\alpha_i$  ( $\text{Cys-3} \rightarrow \text{Ser-3}$ ), y en los tres aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$  ( $\text{Arg-62} \rightarrow \text{Gly-62}$ ,  $\text{Lys-64} \rightarrow \text{Gly-64}$ ,  $\text{Lys-65} \rightarrow \text{Gly-65}$ ).
- vi)  $G\alpha\text{ MYR}^- + G\beta\gamma\text{ RKK}$ , con mutaciones en la glicina N-terminal de  $G\alpha_i$  ( $\text{Gly-2} \rightarrow \text{Ala-2}$ ), y en los tres aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$  ( $\text{Arg-62} \rightarrow \text{Gly-62}$ ,  $\text{Lys-64} \rightarrow \text{Gly-64}$ ,  $\text{Lys-65} \rightarrow \text{Gly-65}$ ).

La tabla 3-2-1 que se muestra a continuación, contiene los resultados finales relativos a la unión de los distintos complejos  $G\alpha\beta\gamma$  a membranas modelo representativas de los principales dominios lipídicos existentes en las membranas biológicas.

**Tabla 3-2-1. Unión de complejos  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$  a membranas modelo.** Los resultados son proporciones medias de unión de proteínas  $G\alpha_1$  y  $G\beta_1$ , constituyentes de los diferentes complejos, a vesículas lipídicas, en tanto por uno,  $\pm$  E.E.M. (n=2-7).

		<i>Composición lipídica</i>					
<i>Heterotrimeros</i>		PC	PC:PE	PC:PE:Cho:SM	PC:PS	PC:PS	PC:PE:PS
			(1:1)	(1:1:1:1)	(4:1)	(3:2)	(2:2:1)
<i>G<math>\alpha</math></i>	<i>Pal<sup>+</sup> G<math>\alpha</math> + WT G<math>\beta\gamma</math></i>	0,077 $\pm$ 0,036	0,197 $\pm$ 0,006	0,089 $\pm$ 0,039	0,048 $\pm$ 0,025	0,019 $\pm$ 0,009	0,142 $\pm$ 0,05
	<i>Pal<sup>-</sup> G<math>\alpha</math> + WT G<math>\beta\gamma</math></i>	0,185 $\pm$ 0,074	0,401 $\pm$ 0,08	0,249 $\pm$ 0,093	0,304 $\pm$ 0,108	0,515 $\pm$ 0,131	0,506 $\pm$ 0,073
	<i>Myr<sup>-</sup> G<math>\alpha</math> + WT G<math>\beta\gamma</math></i>	0,083 $\pm$ 0,039	0,065 $\pm$ 0,025	0,043 $\pm$ 0,013	0,067 $\pm$ 0,009	0,093 $\pm$ 0,018	0,055 $\pm$ 0,018
	<i>Pal<sup>+</sup> G<math>\alpha</math> + RKK G<math>\beta\gamma</math></i>	0,16 $\pm$ 0,045	0,347 $\pm$ 0,091	0,17 $\pm$ 0,107	0,239 $\pm$ 0,073	0,096 $\pm$ 0,013	0,278 $\pm$ 0,079
	<i>Pal<sup>-</sup> G<math>\alpha</math> + RKK G<math>\beta\gamma</math></i>	0,156 $\pm$ 0,029	0,258 $\pm$ 0,028	0,251 $\pm$ 0,058	0,194 $\pm$ 0,036	0,222 $\pm$ 0,057	0,186 $\pm$ 0,018
	<i>Myr<sup>-</sup> G<math>\alpha</math> + RKK G<math>\beta\gamma</math></i>	0,078 $\pm$ 0,018	0,103 $\pm$ 0,031	0,184 $\pm$ 0,04	0,053 $\pm$ 0,018	0,082 $\pm$ 0,032	0,084 $\pm$ 0
<i>G<math>\beta</math></i>	<i>Pal<sup>+</sup> G<math>\alpha</math> + WT G<math>\beta\gamma</math></i>	0,203 $\pm$ 0,032	0,32 $\pm$ 0,032	0,135 $\pm$ 0,044	0,213 $\pm$ 0,026	0,134 $\pm$ 0,027	0,219 $\pm$ 0,069
	<i>Pal<sup>-</sup> G<math>\alpha</math> + WT G<math>\beta\gamma</math></i>	0,166 $\pm$ 0,018	0,311 $\pm$ 0,081	0,13 $\pm$ 0,083	0,173 $\pm$ 0,032	0,301 $\pm$ 0,107	0,406 $\pm$ 0,088
	<i>Myr<sup>-</sup> G<math>\alpha</math> + WT G<math>\beta\gamma</math></i>	0,153 $\pm$ 0,069	0,130 $\pm$ 0,065	0,061 $\pm$ 0,019	0,155 $\pm$ 0,089	0,151 $\pm$ 0,058	0,107 $\pm$ 0,051
	<i>Pal<sup>+</sup> G<math>\alpha</math> + RKK G<math>\beta\gamma</math></i>	0,237 $\pm$ 0,044	0,332 $\pm$ 0,008	0,181 $\pm$ 0,007	0,278 $\pm$ 0,011	0,053 $\pm$ 0,019	0,348 $\pm$ 0,099
	<i>Pal<sup>-</sup> G<math>\alpha</math> + RKK G<math>\beta\gamma</math></i>	0,124 $\pm$ 0,027	0,317 $\pm$ 0,074	0,189 $\pm$ 0,006	0,168 $\pm$ 0,035	0,163 $\pm$ 0,06	0,175 $\pm$ 0,027
	<i>Myr<sup>-</sup> G<math>\alpha</math> + RKK G<math>\beta\gamma</math></i>	0,116 $\pm$ 0,034	0,117 $\pm$ 0,041	0,279 $\pm$ 0,055	0,05 $\pm$ 0,03	0,075 $\pm$ 0,03	0,095 $\pm$ 0,011

En estos estudios de interacción de  $G\alpha\beta\gamma$  con vesículas lipídicas, se analizó la unión a membranas tanto de la proteína  $G\beta$  como de la proteína  $G\alpha_1$  como método de determinación del heterotrimeros. En la figura 3-2-4, se muestra la correlación entre las uniones de las proteínas  $G\beta$  y  $G\alpha$  a las distintas membranas modelo. Se observó un alto grado de correlación positiva en la unión ( $r = 0,7667$ ). Esto puso de manifiesto que el método utilizado fue técnicamente correcto y que las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  permanecieron asociadas de forma estable.

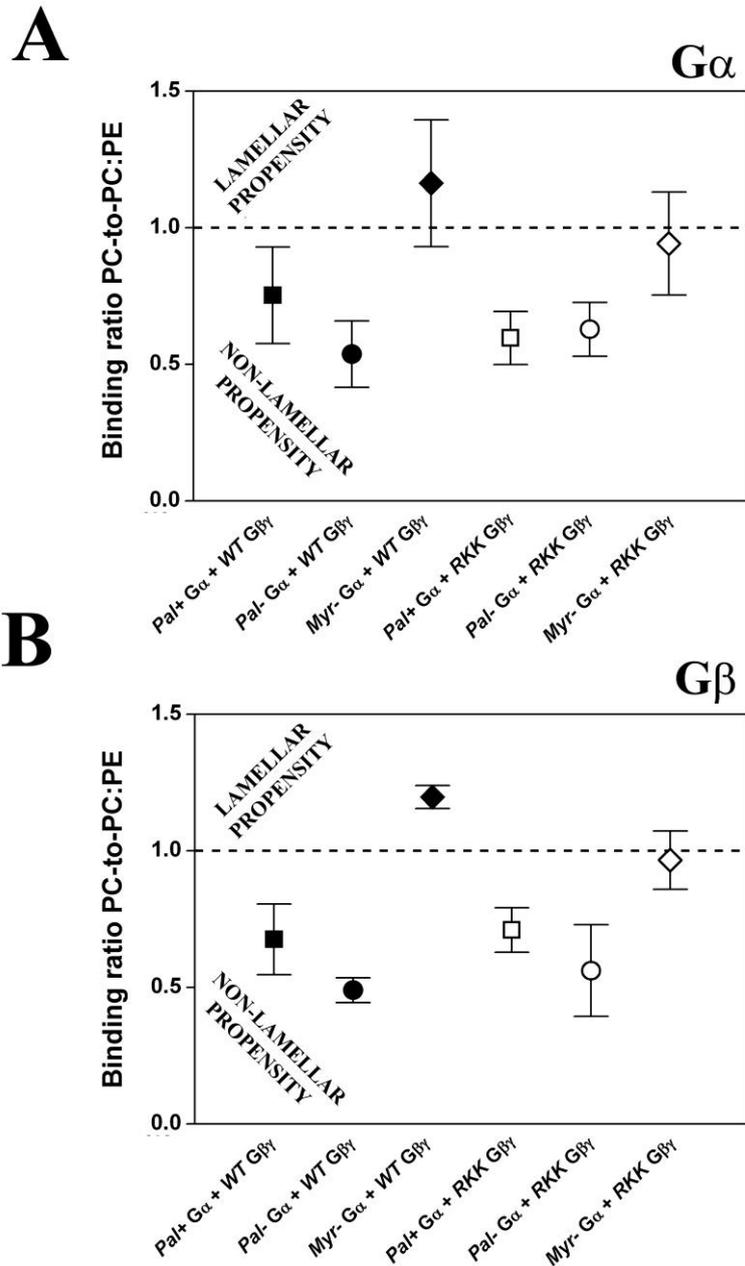


**Figura 3-2-4. Correlación en la unión de subunidades  $G\alpha$  y  $G\beta$ , formando parte de complejos  $G\alpha\beta\gamma$ , a membranas modelo.** Cada punto representa la proporción media de unión de la subunidad  $\alpha$  de un complejo  $G\alpha\beta\gamma$  concreto, a un tipo determinado de vesícula lipídica, frente a la proporción media de unión de la correspondiente subunidad  $\beta$  del complejo en cuestión, a ese mismo tipo de vesícula lipídica. Se muestra la ecuación de la recta (pendiente =  $1,03617 \pm 0,14878$ ; intercepto =  $- 0,01902 \pm 0,03098$ ), con un coeficiente de correlación  $r_{xy} = 0,7667$ .

***Interacción de complejos heterotriméricos  $G\alpha\beta\gamma$  con membranas modelo ricas en PE.***

La unión de todos los complejos  $G\alpha\beta\gamma$  miristoilados estudiados a membranas modelo compuestas de PC y PE (PC:PE 1:1, mol:mol), fue significativamente mayor que a vesículas de PC (figuras 3-2-5 y 3-2-6), como lo demuestran los perfiles de unión de las proteínas  $G\alpha$  y  $G\beta$ , integrantes de esos complejos heterotriméricos (figura 3-2-5).

Así pues, la presencia de ácido mirístico unido a  $G\alpha$  en un complejo  $G\alpha\beta\gamma$ , portador además de un resto geranilgeraniol unido a la subunidad  $G\gamma_2$ , posibilitó la interacción preferente de todo el trímero con dominios lipídicos ricos en PE. Lo contrario, es decir, la existencia de una proteína  $G\alpha$  no miristoilada formando parte del heterotrímero, supuso la pérdida de esa capacidad de interacción del complejo multiproteico (figuras 3-2-5 y 3-2-6).



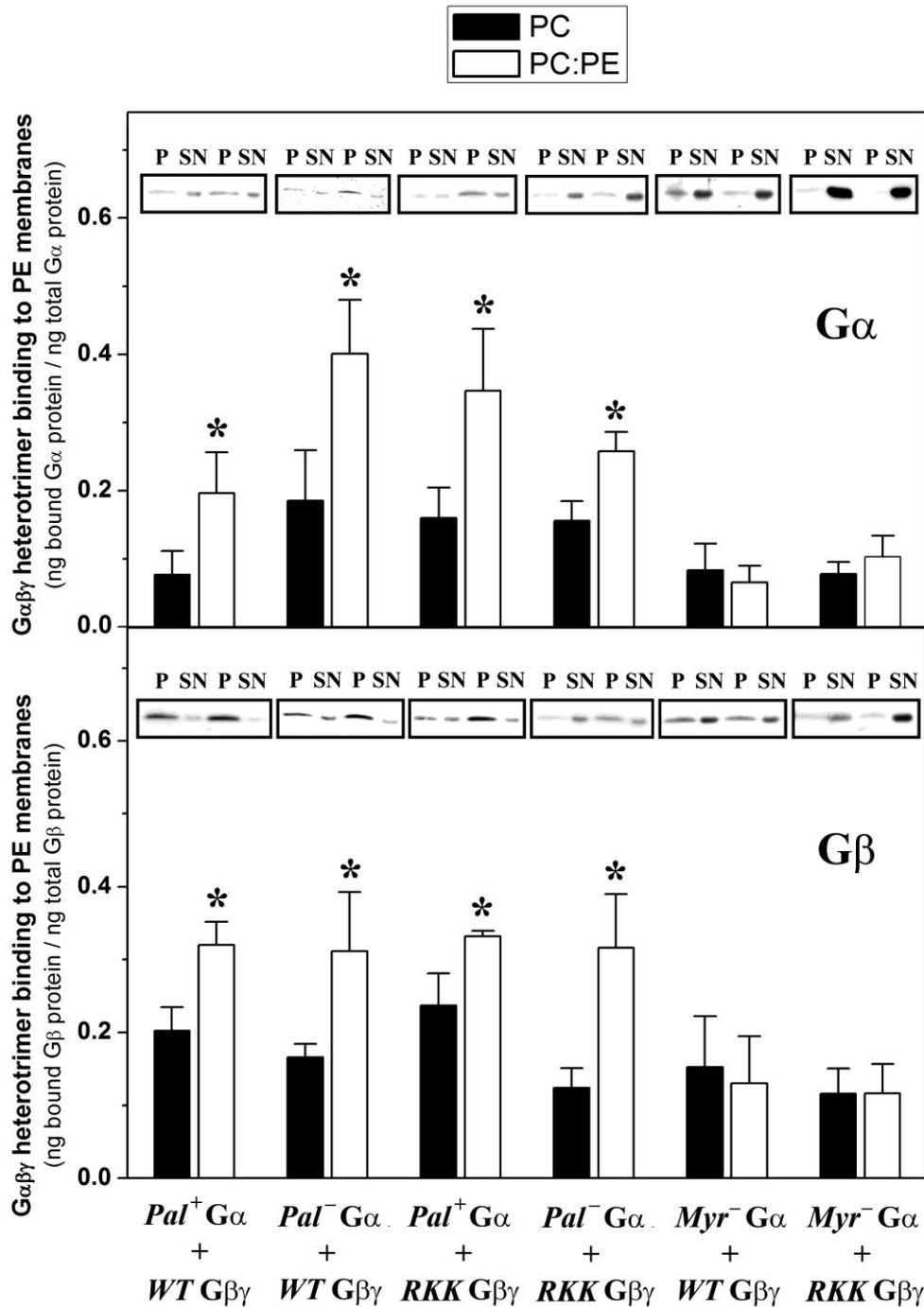
**Figura 3-2-5. Preferencia lamelar / no lamelar de los distintos trímeros  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ .** Se muestra el cociente resultante de dividir la proporción de unión de cada heterotrímero  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  a vesículas de PC entre la proporción de su unión a vesículas de tipo PC:PE. A, determinación de la preferencia lamelar / no lamelar de los distintos trímeros  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  estudiados, a partir de las propiedades de unión de la subunidad  $G\alpha$  de esos complejos a vesículas de PC, por un lado, y de PC:PE, por otro B, ídem, teniendo en cuenta las propiedades de unión de la subunidad  $G\beta$  de esos complejos.

Estos resultados, y por extensión, todos los resultados de unión a membranas modelo de este capítulo se refieren a complejos  $G\alpha\beta\gamma$  geranilgeranilados. No se han incluido los resultados relativos a la interacción con membranas modelo de un heterotrímero  $G\alpha\beta\gamma$  constituido por una subunidad  $G\gamma_2$  *ger*<sup>-</sup>, debido al bajo rendimiento en la obtención de los distintos complejos heterotriméricos no geranilgeranilados, durante los procesos de

purificación descritos (véanse los apartados 6.2.5.2 y 6.2.6 de “Materiales y Métodos” para más detalles). A esto último, hubo que añadir la dificultad para la consecución de cantidad suficiente de un complejo heterotrimérico no geranilgeranilado estable. En cualquier caso, los datos obtenidos con el heterodímero explican de forma muy elocuente el papel del geranilgeranilo en la interacción de proteínas G con membranas.

La palmitoilación en la subunidad  $G\alpha$  disminuyó la preferencia del heterotrímico no mutado de unirse a membranas enriquecidas en PE, aunque no de un modo significativo. Por su parte, la triple mutación de los aminoácidos básicos del extremo C-terminal de  $G\gamma_2$  no alteró la tendencia general de los heterotrímicos miristoilados a interaccionar más con membranas constituídas por PC y PE que con aquellas constituídas sólo por PC (figura 3-2-6).

Si bien la ausencia de ácido mirístico unido a la subunidad  $\alpha$  supuso la pérdida de la unión preferencial de todo el complejo heterotrimérico a vesículas de PC y PE, la triple mutación en el extremo C-terminal de  $G\gamma_2$  contribuyó a acercar ligeramente al heterotrímico no miristoilado hacia la zona de propensión no lamelar (figura 3-2-5). Por lo tanto, también los aminoácidos *Arg-62*, *Lys-64* y *Lys-65* de  $G\gamma_2$  estarían jugando cierto papel determinante en la preferencia del complejo multiproteico por dominios lipídicos con un menor grado de ordenamiento y con tendencia a formar estructuras de tipo no lamelar.



**Figura 3-2-6. Unión de proteínas  $G\alpha\beta\gamma$  a membranas lamelares y no lamelares.** *Panel superior*, unión de la subunidad  $\alpha$  de los complejos  $G\alpha\beta\gamma$  indicados en el recuadro a vesículas de PC y de PC:PE (1:1). *Panel inferior*, unión de la subunidad  $\beta$  de esos mismos complejos a vesículas de PC y de PC:PE (1:1). Se muestran “immunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los resultados representados corresponden a la proporción media de unión de cada proteína G a vesículas  $\pm$  E.E.M (n=2-7). \*,  $p < 0,05$ .

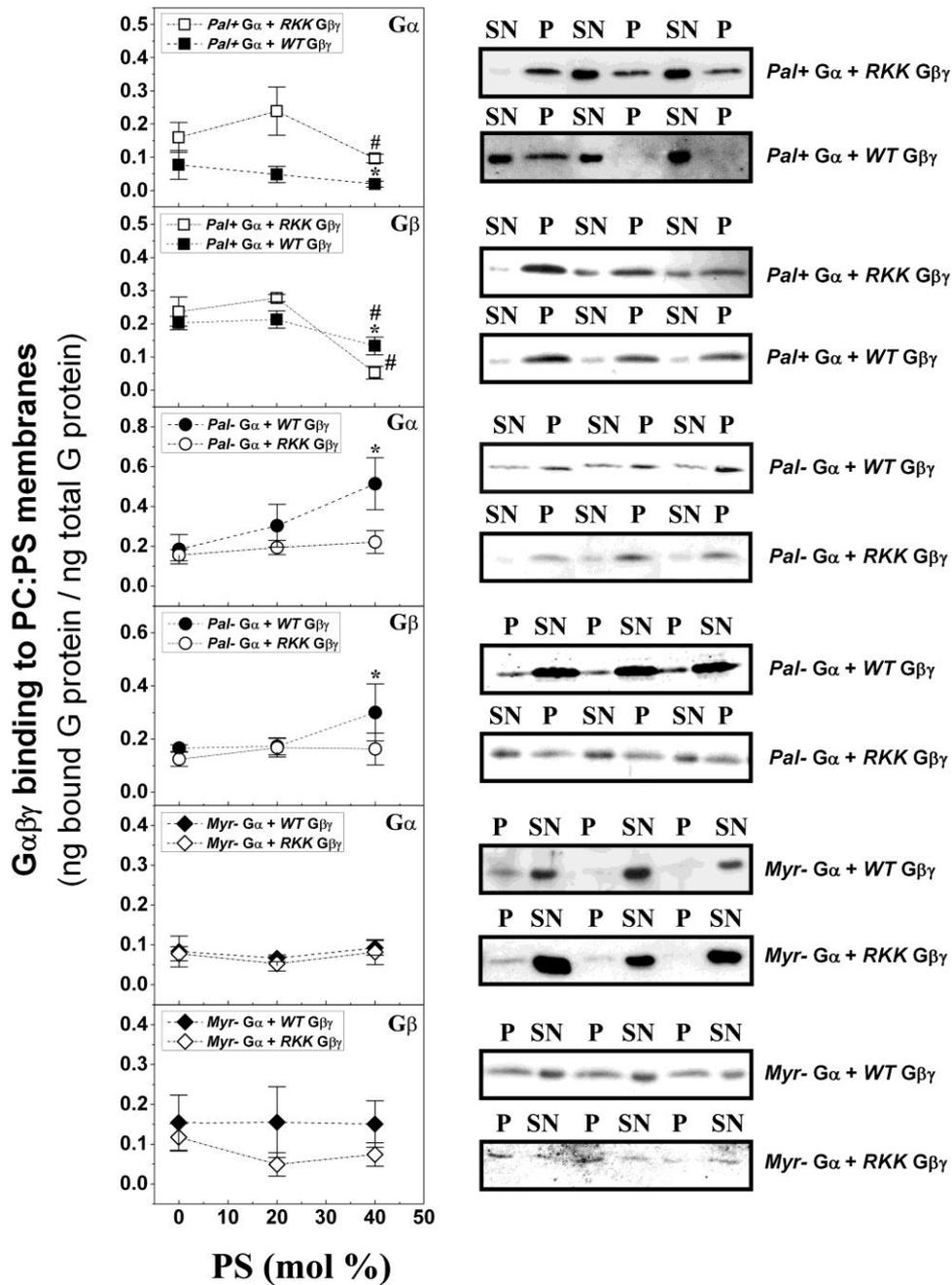
### ***Interacción de complejos heterotriméricos $G\alpha\beta\gamma$ con membranas modelo ricas en PS.***

En la interacción de los complejos  $G\alpha\beta\gamma$  con membranas modelo constituídas por PC y PS (20% y 40% de PS, mol/mol), se observó un paralelismo entre el comportamiento de las proteínas monoméricas  $G\alpha$  (figura 1-2-5) y los heterotrimeros  $G\alpha\beta\gamma$  constituídos por el dímero  $G\beta_1\gamma_2$  *WT* (figura 3-2-7). Así, el heterotrimero miristoilado, pero no palmitoilado, tendió a unirse más a vesículas de PS, siendo la unión a vesículas con un 40% de PS (mol/mol) significativamente mayor que a vesículas de PC. La palmitoilación de la subunidad  $G\alpha$ , sin embargo, provocó el efecto contrario, de manera que el complejo  $G\alpha\beta\gamma$  experimentó una repulsión electrostática como consecuencia del aumento de PS en las vesículas lipídicas (figura 3-2-7).

Otra cuestión fundamental se dedujo del comportamiento de los heterotrimeros constituídos por la proteína  $G\alpha_i1$  *Pal<sup>-</sup>*. Así, los diferentes perfiles de unión a PS de los complejos  $G\alpha$  *Pal<sup>-</sup>* +  $G\beta\gamma$  *WT* y  $G\alpha$  *Pal<sup>-</sup>* +  $G\beta\gamma$  *RKK*, pusieron de manifiesto la participación crítica de los tres aminoácidos con carga positiva del extremo C-terminal de  $G\gamma_2$  en la interacción directa con la fosfatidilserina de las membranas modelo. Al estar ausente la carga positiva aportada por los tres aminoácidos básicos del extremo de  $G\gamma_2$ , ya no tuvo lugar el incremento en la unión a vesículas ricas en el fosfolípido aniónico PS (PC:PS 3:2 mol:mol) (figura 3-2-7), observada en el caso del complejo  $G\alpha$  *Pal<sup>-</sup>* +  $G\beta\gamma$  *WT*, debido a atracciones de tipo electrostático.

Los dos tipos de heterotrimeros palmitoilados estudiados se unieron menos a membranas con un 40% de PS (mol %) que a vesículas de PC. Este comportamiento similar de los complejos  $G\alpha$  *Pal<sup>+</sup>* +  $G\beta\gamma$  *WT* y  $G\alpha$  *Pal<sup>+</sup>* +  $G\beta\gamma$  *RKK*, indicó una pérdida de relevancia de los aminoácidos con carga positiva del extremo C-terminal de  $G\gamma_2$  en la interacción del heterotrimero con membranas de PS, debida a la transición en el estado de acilación de  $G\alpha_i1$  (figura 3-2-7). Como se discutirá más adelante, este efecto podría deberse a un acercamiento de los aminoácidos con carga negativa predominantes en el lado más ancho de la hélice  $\beta$  de la proteína  $G\beta_1$  hacia la superficie de la membrana, inducido por la presencia del resto palmitato en la región N-terminal de la proteína  $G\alpha_i1$  (figura 4-7).

A diferencia de los heterotrimeros miristoilados, los no miristoilados no se vieron afectados de un modo significativo por la presencia de PS en la bicapa lipídica (figura 3-2-7).

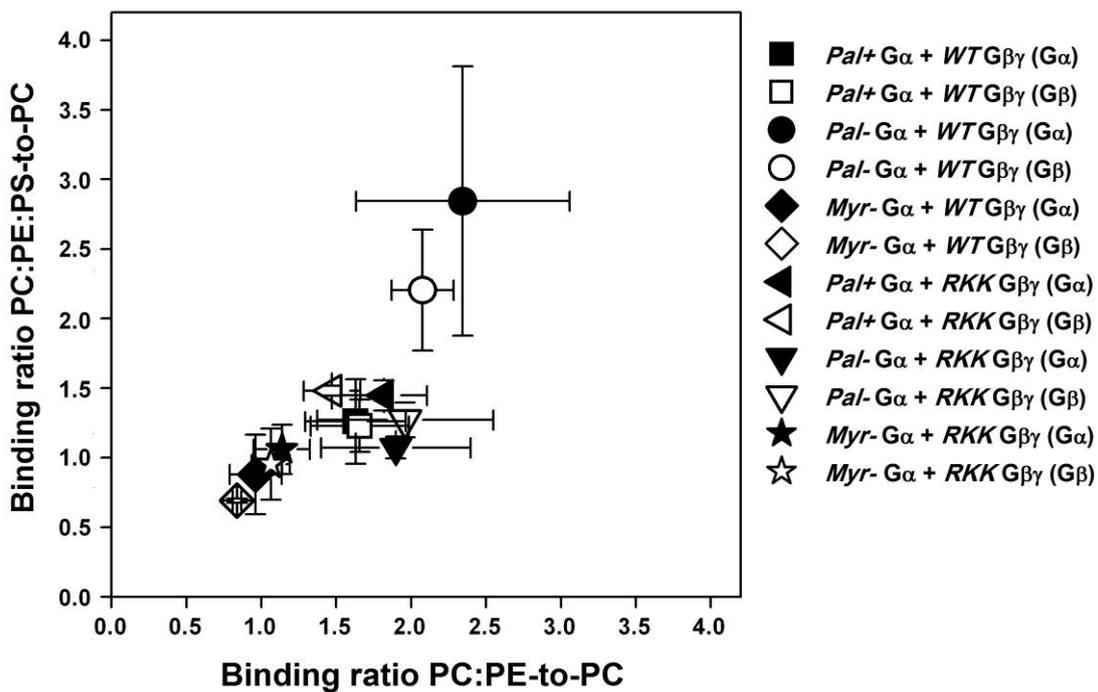


**Figura 3-2-7. Unión de los complejos Gαβγ a vesículas de PC y de PC:PS.** Las gráficas muestran la unión de las diferentes construcciones de proteínas Gαβγ, determinada por la cuantificación de las subunidades α y β, a membranas con distinto contenido de PS. Se muestran “inmunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los resultados corresponden a la media de unión de cada proteína G a vesículas ± E.E.M (n=2-7). \*,  $p < 0,05$ . “#” indica diferencias significativas respecto a la unión a PC:PS (4:1).

*Interacción de complejos heterotriméricos  $G\alpha\beta\gamma$  con membranas modelo constituídas por PC, PE y PS.*

Siguiendo la misma línea que en el capítulo 2, se estudió la unión del complejo  $G\alpha\beta\gamma$  a membranas modelo constituídas por PC, PE y PS, con el fin de comprender mejor el modo en que tiene lugar la interacción del trómero con dichos lípidos. Estos estudios permitieron, además, corroborar resultados clave obtenidos de manera independiente empleando membranas de PE, por un lado, y membranas de PS por otro.

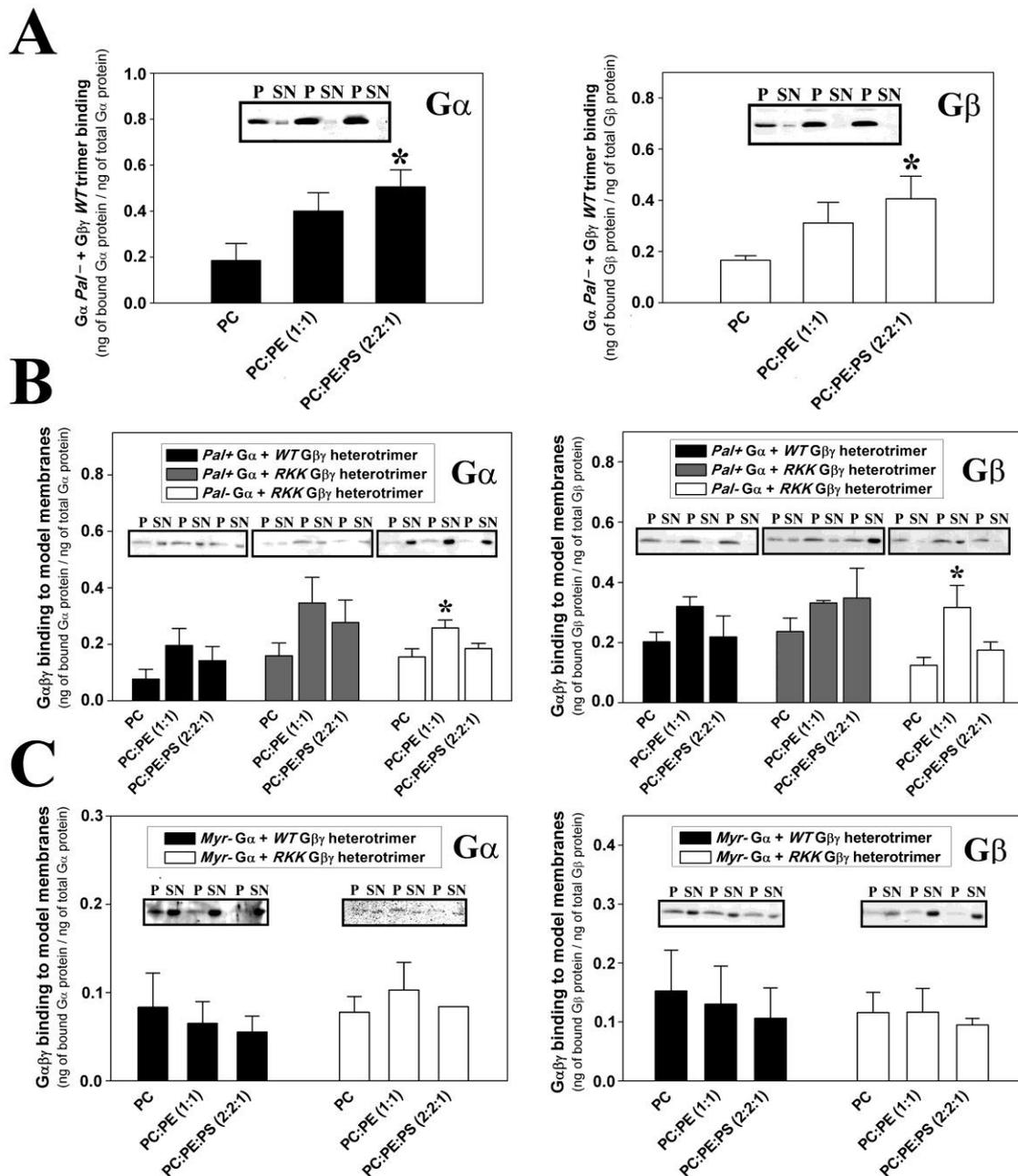
En la figura 3-2-8, se representa la razón de la unión a PC:PE:PS respecto a la unión a PC frente a la razón de la unión a PC:PE respecto a la unión a PC para cada uno de los distintos trómeros geranilados (midiendo la unión de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ). El grupo con los valores más altos de ambas relaciones fue el formado por las proteínas  $G\alpha_{i1}$  y  $G\beta_1$  del complejo  $G\alpha^{Pal^-} + G\beta\gamma^{WT}$ .



**Figura 3-2-8. Distribución diferencial de los diferentes heterotrimeros  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$  construídos, a partir de su interacción con membranas de PC, PC:PE (1:1) y PC:PE:PS (2:2:1).** Estas diferentes agrupaciones de heterotrimeros fueron el resultado de representar, en el eje de abscisas, el cociente que se obtiene de dividir la proporción media de unión de cada trómero a vesículas de tipo PC entre la proporción media de su unión a vesículas de tipo PC:PE (1:1). Para completar el gráfico, en el otro eje se representó la relación entre la proporción media de unión de los trómeros anteriores a vesículas de PC y la proporción media de su unión a vesículas de tipo PC:PE:PS (2:2:1). Junto con los valores promedio de los diferentes cocientes, se representaron en ambos ejes los errores estándar de la media.

El estudio muestra la existencia de varios comportamientos. El comportamiento del complejo heterotrimérico no palmitoilado en su interacción con vesículas de PE por un lado, y de PS, por otro, fue parecido al de los dímeros con preferencia por membranas ricas en lípidos pro-no lamelares (figuras 2-2-9 y 2-2-12). Además, las proporciones de unión de este heterotrímico a vesículas de tipo PC:PE fueron de las más altas obtenidas (figura 3-2-6). En el caso de la interacción con vesículas de PS, el complejo  $G\alpha^{Pal^-} + G\beta\gamma^{WT}$  fue el de mayor capacidad de interacción. De acuerdo con estos resultados, las proporciones más altas de unión a membranas modelo constituídas por PE y PS deberían de corresponder también a ese heterotrímico, como así lo demuestran los resultados de las figuras 3-2-8 y 3-2-9. Estos resultados fueron de gran importancia, pues corroboraron los obtenidos en los estudios de interacción llevados a cabo con vesículas de PE, por un lado, y con vesículas de PS, por otro. Tal y como se muestra en la figura 3-2-9, hubo una acción cooperativa de los lípidos PE y PS, induciendo una unión del heterotrímico  $G\alpha^{Pal^-} + G\beta\gamma^{WT}$  a membranas modelo constituídas por ambos lípidos mayor que a membranas de PE, por una parte, o a membranas de PS, por otra (figura 3-2-9 A).

El grupo con los valores más bajos de las relaciones representadas en la figura 3-2-8 fue el constituido por los dos complejos  $G\alpha\beta\gamma^{MYR^-}$  estudiados. La unión de las distintas proteínas a membranas de tipo PC:PE correlacionó con la unión a membranas de tipo PC:PE:PS. Así, el valor más bajo de la razón de unión a PC:PE respecto a la unión a PC correspondió al heterotrímico  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{WT}$ , al igual que el valor más bajo de la razón de unión a PC:PE:PS respecto a la unión a PC. A continuación, en orden creciente del valor de las relaciones estudiadas se situó el complejo  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{RKK}$ , de acuerdo con una relación de tipo lineal (figura 3-2-8). Aunque todos los valores de esas razones estuvieron próximos a 1, el heterotrímico  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{WT}$  mostró una afinidad por PC algo mayor que  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{RKK}$ . Ninguno de los heterotrímeros no miristoilados tuvo tendencia a interactuar más con membranas de PE o de PS que con membranas de PC (figuras 3-2-6 y 3-2-7); y, como cabría esperar, tampoco lo hicieron con membranas constituídas por PE y PS (figura 3-2-9 C). En todos los casos se observó gran paralelismo entre las medidas realizadas cuantificando (immunoblot) las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de cada uno de los complejos estudiados.



**Figura 3-2-9. Unión de los complejos G $\alpha\beta\gamma$  arriba indicados a vesículas de PC, PC:PE y PC:PE:PS.** A, unión de G $\alpha$  *Pal*<sup>-</sup> + G $\beta\gamma$  WT a los tipos de vesículas mencionados. A la izquierda, unión a membranas correspondiente a la proteína G $\alpha$ . A la derecha, unión de G $\beta$  B, unión de G $\alpha\beta\gamma$  G $\alpha$  *Pal*<sup>+</sup> + G $\beta\gamma$  WT, G $\alpha$  *Pal*<sup>+</sup> + G $\beta\gamma$  RKK y G $\alpha$  *Pal*<sup>-</sup> + G $\beta\gamma$  RKK a vesículas de PC, PC:PE y PC:PE:PS. En el gráfico de la izquierda, interacción correspondiente a la subunidad  $\alpha$ . En el de la derecha, interacción de la subunidad  $\beta$ . C, unión de G $\alpha$  *Myr*<sup>-</sup> + G $\beta\gamma$  WT y G $\alpha$  *Myr*<sup>-</sup> + G $\beta\gamma$  RKK a membranas de PC, PC:PE y PC:PE:PS. A la izquierda, unión de G $\alpha$ . A la derecha, unión de G $\beta$ . Se muestran “immunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los resultados corresponden a la media de unión de cada proteína G a vesículas  $\pm$  E.E.M (n=2-7). \*,  $p < 0,05$ .

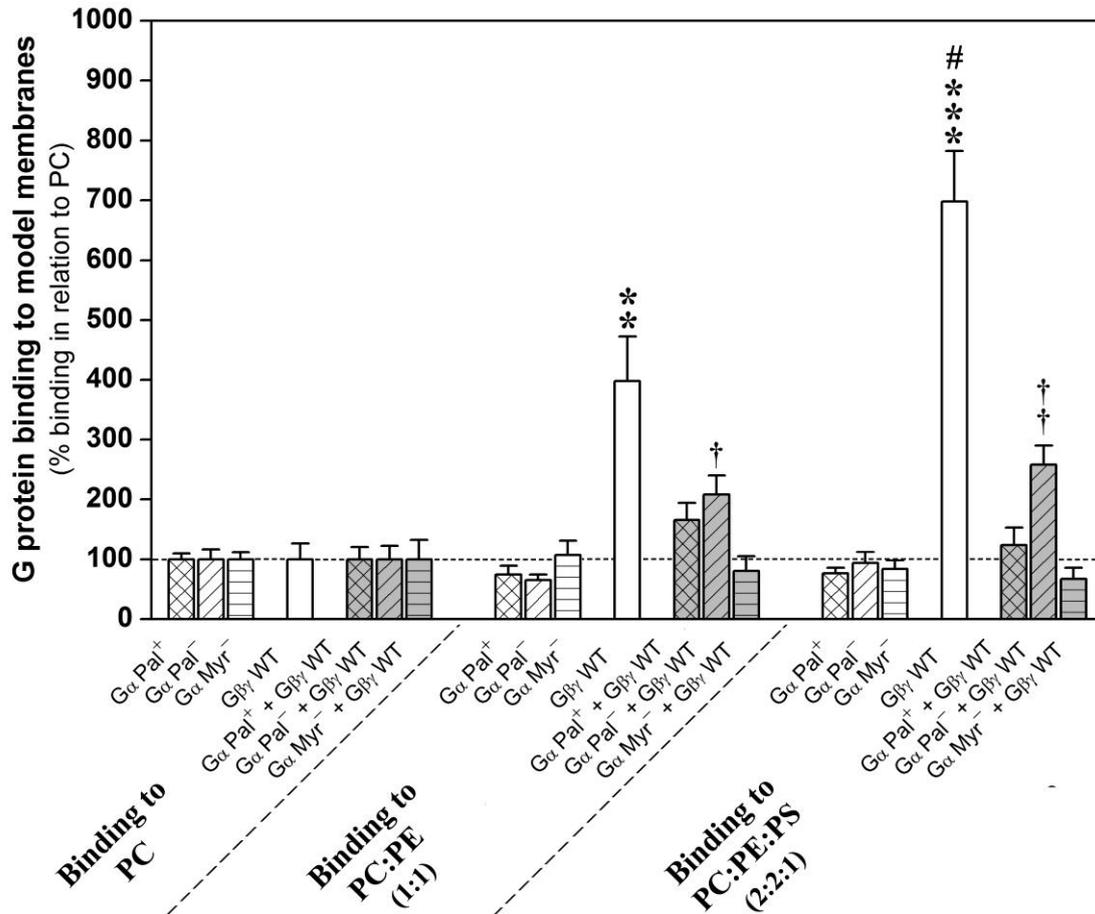
El tercero de los grupos de la figura 3-2-8 se situó entre los dos anteriores. Los tres complejos heterotriméricos que formaron parte de este grupo compartieron entre otras características, el hecho de estar miristoilados y granilgeranilados, y el de mostrar una marcada tendencia a interactuar con vesículas lipídicas constituídas por PC y PE

(figuras 3-2-5 y 3-2-6). Sin embargo, en la interacción de los complejos palmitoilados con vesículas constituídas por PC, PE y PS hubo un hecho diferenciador, no observado en el caso del complejo  $G\alpha\text{ Pal}^- + G\beta\gamma\text{ RKK}$ : en casi todas las proteínas analizadas de los dos complejos palmitoilados, hubo una unión mayor a vesículas de tipo PC:PE:PS que a vesículas de PC, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (figura 3-2-9 B). Sólo la proteína  $G\beta$  del complejo  $G\alpha\text{ Pal}^+ + G\beta\gamma\text{ WT}$  tuvo un perfil de unión parecido a los perfiles del complejo  $G\alpha\text{ Pal}^- + G\beta\gamma\text{ RKK}$ , aunque no tan definido, como lo demuestran las diferencias significativas en la unión de  $G\alpha\text{ Pal}^- + G\beta\gamma\text{ RKK}$  a vesículas de PE, obtenidas al aplicar un test ANOVA (figura 3-2-9 B).

En la figura 3-2-10, se muestra una gráfica comparativa general que resume el comportamiento de las distintas construcciones recombinantes generadas, en presencia de membranas modelo ricas en PE y PS. Considerando la unión de cada una de esas construcciones a membranas de PC como el 100%, se analizó la unión relativa de cada una de ellas a vesículas de tipo PC:PE, por un lado, y de tipo PC:PE:PS por otro. De todas las proteínas recombinantes y complejos analizados, el dímero  $G\beta_1\gamma_2$  fue, con gran diferencia, el que mostró una mayor capacidad de interacción con membranas de PE (50%, mol/mol), por un lado, y de PE (40%, mol/mol) más PS (20%, mol/mol), por otro (figura 3-2-10).

De entre todos los heterotrímeros estudiados, el complejo  $G\alpha\text{ Pal}^- + G\beta\gamma\text{ WT}$  fue el más claro ejemplo de influencia del dímero  $G\beta\gamma$  sobre el comportamiento de la proteína  $G\alpha_i_1$ , en su interacción con membranas modelo. Así pues, con una tendencia similar a la del dímero  $G\beta_1\gamma_2$ , pero no tan marcada, el complejo  $G\alpha\text{ Pal}^- + G\beta\gamma\text{ WT}$  también mostró preferencia por membranas modelo ricas en PE; y más aún, por membranas ricas en PE y PS (figura 3-2-10).

En el caso de  $G\alpha\text{ Pal}^+ + G\beta\gamma\text{ WT}$ , también existió una unión preferente a membranas ricas en PE: pero, como ya se ha mencionado en esta misma sección, no se produjo el incremento en la unión a vesículas de tipo PC:PE:PS, característico de los complejos  $G\beta\gamma$  y  $G\alpha\text{ Pal}^- + G\beta\gamma\text{ WT}$  (figura 3-2-10). Ni el complejo  $G\alpha\text{ Myr}^- + G\beta\gamma\text{ WT}$ , ni tampoco la proteína  $G\alpha_i_1\text{ Myr}^-$  por sí sola, se unieron de manera preferente a vesículas lipídicas constituídas por PE o bien, por PE más PS. Sin embargo, es muy importante el hecho de que la falta de mirístico en la subunidad  $\alpha$  no tuvo el efecto dramático de reducción de unión de  $G\alpha_i_1\beta_1\gamma_2$  que se aprecia para el monómero  $G\alpha_i_1$  (figuras 1-2-4 a 1-2-6).



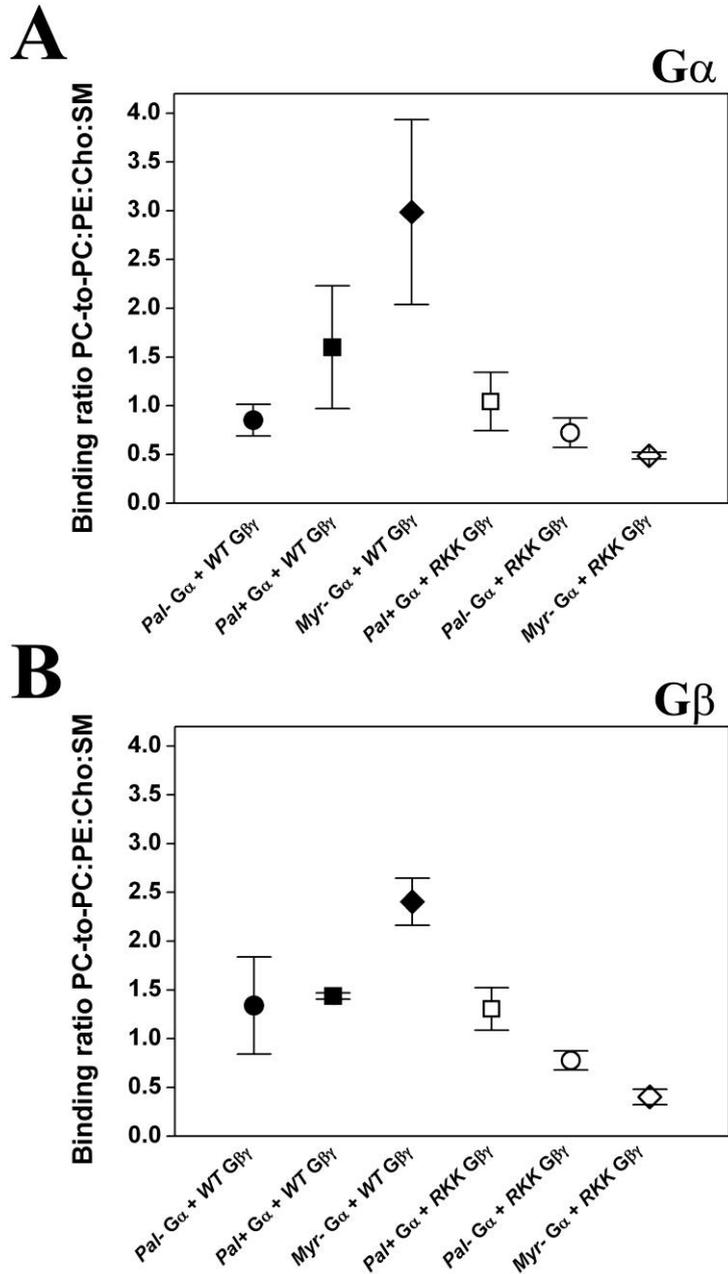
**Figura 3-2-10. Unión de distintas proteínas  $G\alpha_i$  y complejos de proteínas G a membranas de PC, PC:PE y PC:PE:PS.** En cada caso, se representó la unión media en % a membranas de tipo PC:PE (1:1) y PC:PE:PS (2:2:1) de cada proteína G respecto a su unión a vesículas de PC, considerada como 100%  $\pm$  E.E.M (n=2-7). “\*” indica la existencia de diferencias significativas en la unión del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  a las distintas vesículas lipídicas ricas en PE respecto a su unión a PC (\*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ). “#” indica la existencia de diferencias significativas en la unión del dímero a PC:PE:PS (2:2:1) respecto a su unión a PC:PE (#,  $p < 0,05$ ). “†” indica la existencia de diferencias significativas en la unión del trímero  $G\alpha_i Pal^- + G\beta_1\gamma_2 WT$  a las distintas vesículas lipídicas ricas en PE respecto a su unión a PC (††,  $p < 0,01$ ; †,  $p < 0,05$ ).

Por su parte, las proteínas  $G\alpha Pal^+$  y  $G\alpha Pal^-$ , a las que hace referencia el capítulo 1, se unieron menos a membranas ricas en PE que a membranas formadas sólo por PC. La unión de  $G\alpha Pal^+$  a membranas constituídas por PE y PS continuó siendo más baja que a PC. En cambio, la proteína  $G\alpha Pal^-$  interaccionó con vesículas de PC de manera muy similar a como lo hizo con vesículas de tipo PC:PE:PS (figura 3-2-10).

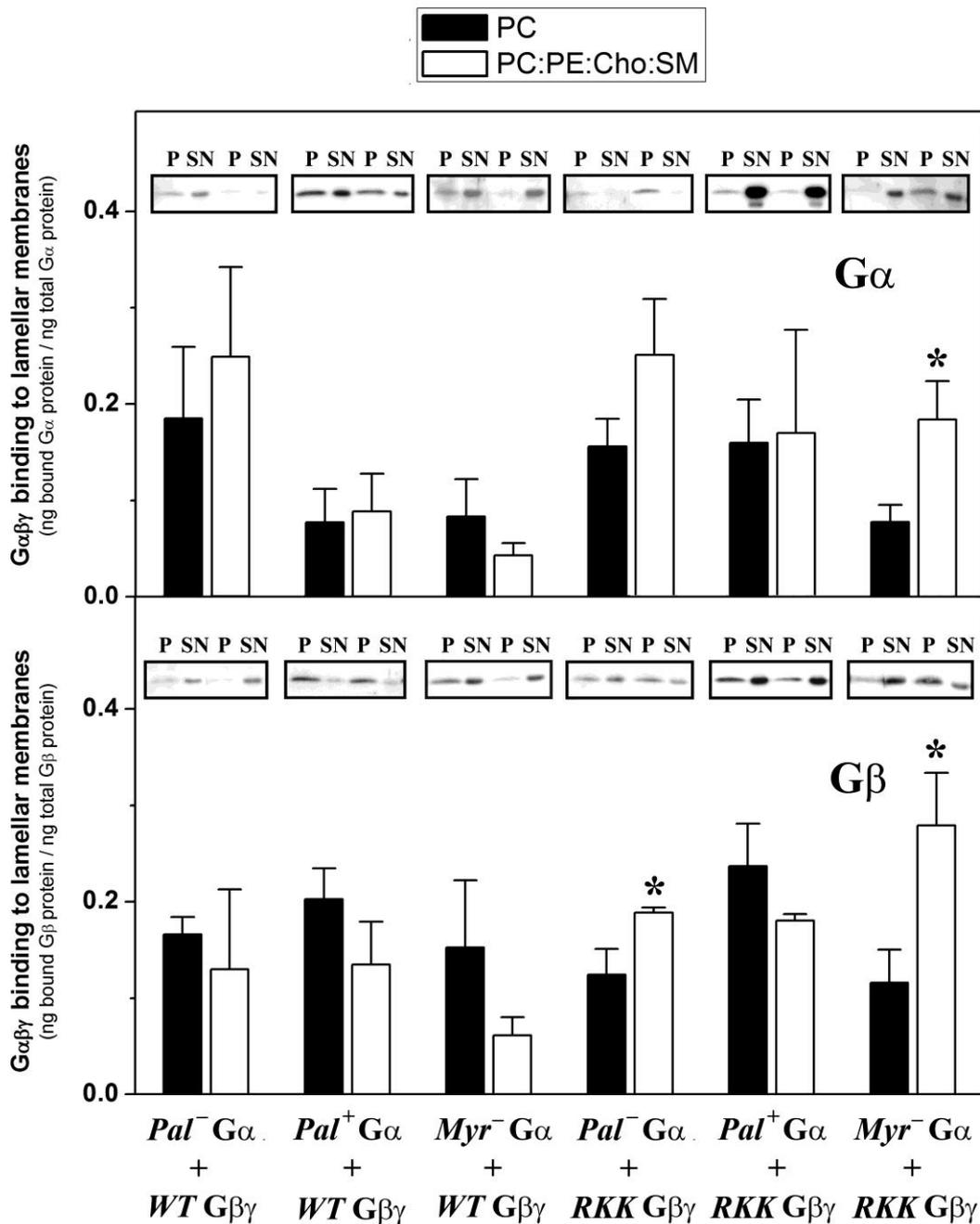
### ***Interacción de complejos $G\alpha\beta\gamma$ con membranas modelo constituídas por PC, PE, Cho y SM.***

Las membranas constituídas por PC, PE, Cho y SM presentan características similares a las membranas naturales, ya que presentan dominios desordenados ( $L_d$ ) y ordenados ( $L_o$ , similares a los “lipid raft”). Los mayores efectos en la unión de  $G\alpha\beta\gamma$  a membranas modelo, debidos a la existencia de dominios con estructura  $L_o$ , ricos en colesterol y esfingomielinina, fueron observados en los heterotrimeros no miristoilados  $G\alpha Myr^- + G\beta\gamma WT$  y  $G\alpha Myr^- + G\beta\gamma RKK$  (figura 3-2-11). El complejo  $G\alpha Myr^- + G\beta\gamma WT$  mostró una preferencia por dominios con estructura de tipo  $L_d$  (figura 3-2-11), con una mayor unión a vesículas de PC que a aquéllas constituídas por PC, PE, Cho y SM, si bien, en este caso, no hubo diferencias estadísticamente significativas (figura 3-2-12). Por su parte, el comportamiento del heterotrimerio  $G\alpha Myr^- + G\beta\gamma RKK$ , fue opuesto al de  $G\alpha Myr^- + G\beta\gamma WT$ , mostrando una unión significativamente mayor a membranas de tipo PC:PE:Cho:SM, como lo demuestran las figuras 3-2-11 y 3-2-12.

La influencia tan notable de los tres aminoácidos básicos situados en la región C-terminal de  $G\gamma_2$ , observada en las interacciones de complejos  $G\alpha\beta\gamma Myr^-$  con dominios de alto ordenamiento lipídico ( $L_o$ ), no se dio en el caso de los complejos  $G\alpha\beta\gamma Myr^+$  (figuras 3-2-11 y 3-2-12). Sólo el complejo  $G\alpha Pal^- + G\beta\gamma RKK$  pareció conservar todavía algo de esa propiedad característica de  $G\alpha Myr^- + G\beta\gamma RKK$ . En este sentido, la proteína  $G\beta_1$  integrante de ese complejo, se unió significativamente más a membranas de tipo PC:PE:Cho:SM que a membranas de PC (figura 3-2-12). De hecho, el perfil de unión de los distintos complejos  $G\alpha\beta\gamma$  con las tres mutaciones en  $G\gamma_2$ , reveló una pérdida de su capacidad para interactuar con dominios de estructura  $L_o$ , en función del grado de acilación de  $G\alpha$ . Este comportamiento apareció doblemente representado en la figura 3-2-11. Así, la relación de la unión a PC respecto a la unión a PC:PE:Cho:SM correspondiente al complejo  $G\alpha Pal^+ + G\beta\gamma RKK$  fue muy similar a la del complejo  $G\alpha Pal^+ + G\beta\gamma WT$ , situadas ambas dentro del área de valores que indican una unión mayor a vesículas de PC (figura 3-2-11).



**Figura 3-2-11. Preferencia por dominios lipídicos de tipo “raft”, con estructura  $L_0$ , de los distintos complejos  $G\alpha\beta\gamma$  arriba indicados.** Se muestra el cociente resultante de dividir la proporción de unión de cada heterotrímero  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  a vesículas de PC entre la proporción de su unión a vesículas de tipo PC:PE:Cho:SM, formadas por dominios lipídicos con estructura  $L_0$ . Valores de ese cociente menores que 1 indican preferencia en la unión a vesículas de tipo PC:PE:Cho:SM, con dominios de tipo “raft”. A, determinación de la preferencia por dominios de tipo “raft” de los distintos trímeros  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  estudiados, a partir de las propiedades de unión de la subunidad  $G\alpha$  de esos complejos a vesículas de PC, por un lado, y a vesículas de PC:PE:Cho:SM, por otro. B, ídem, teniendo en cuenta las propiedades de unión de la subunidad  $G\beta$  de todos esos complejos  $G\alpha\beta\gamma$ .



**Figura 3-2-12. Unión de los complejos  $G\alpha\beta\gamma$  a vesículas de PC y de PC:PE:Cho:SM.** *Panel superior*, unión de la subunidad  $\alpha$  de los complejos  $G\alpha\beta\gamma$  indicados en el recuadro a vesículas de PC y de PC:PE:Cho:SM (1:1:1:1). *Panel inferior*, unión de la subunidad  $\beta$  de esos mismos complejos a vesículas de PC y de PC:PE:Cho:SM (1:1:1:1). Se muestran “inmunoblots” representativos de cada experimento de unión. Los resultados corresponden a la proporción media de unión de cada proteína G a vesículas  $\pm$  E.E.M (n=2-7). \*,  $p < 0,05$ .

En resumen, los tres aminoácidos básicos C-terminales de  $G\gamma_2$  influyeron de manera determinante en la unión de los complejos  $G\alpha\beta\gamma$  *Myr*<sup>-</sup> a membranas con dominios  $L_o$ . En el caso de  $G\alpha$  *Myr*<sup>-</sup> +  $G\beta\gamma$  *WT*, la presencia de esos aminoácidos dificultó la

interacción, mientras que su ausencia en el complejo  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{RKK}$ , la favoreció. Y entre ellos dos, se situaron todos los complejos miristoilados, en cuyas interacciones no jugaron un papel tan relevante los tres aminoácidos C-terminales de  $G\gamma_2$  (figura 3-2-11).

Mientras que las formas miristoiladas de los heterotrimeros con las tres mutaciones en el extremo C-terminal de  $G\gamma_2$  mostraron una mayor capacidad para interactuar con vesículas de PC que la forma no miristoilada, en el caso de los heterotrimeros formados por la proteína  $G\gamma_2^{WT}$ , la tendencia se invirtió, de manera que la forma no miristoilada mostró una unión relativa a vesículas de PC mayor que las formas miristoiladas.

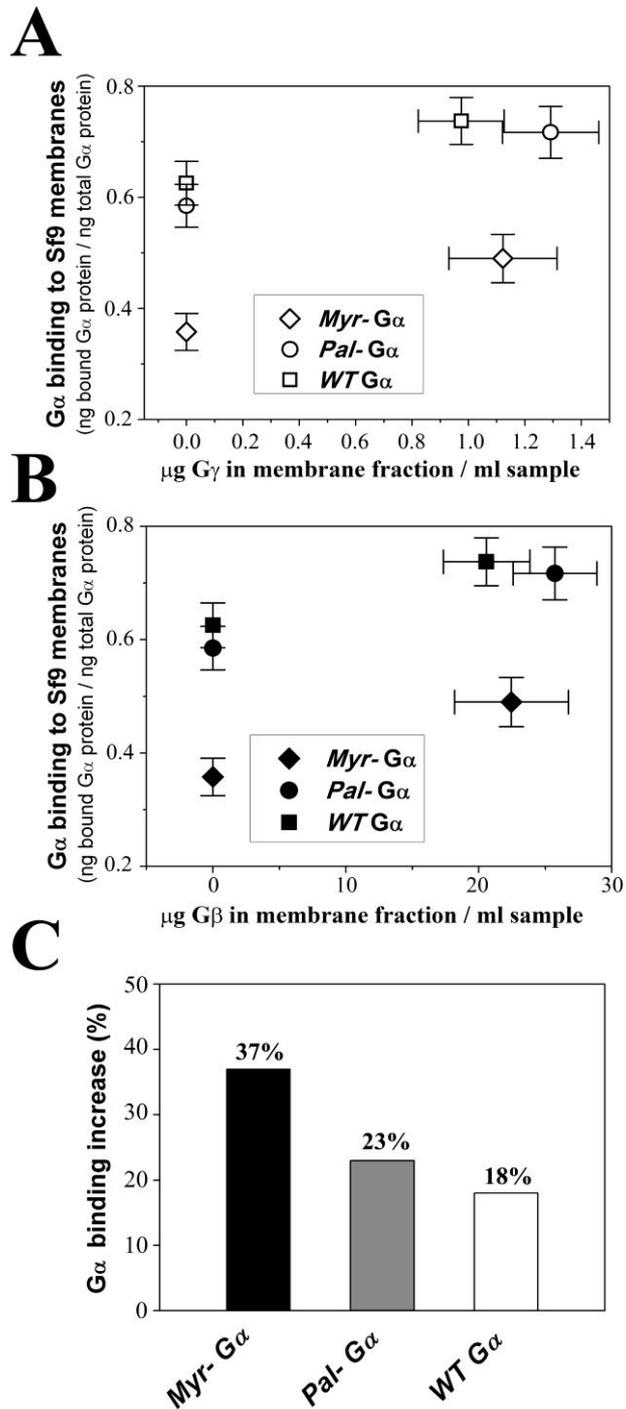
De nuevo, aquí se observa que la falta de mirístico no tiene un efecto tan marcado sobre la unión del heterotrimerio  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$  (a diferencia de lo que ocurre con el monómero  $G\alpha_1$ ), lo que da una idea de la importancia del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  en estas interacciones.

### **3.2.3. Interacciones de proteínas $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ con membranas biológicas.**

Se estudió la interacción de diferentes proteínas  $G\alpha_1$ ,  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$ , coexpresadas en células Sf9, con membranas de dichas células. Las regiones N-terminal de  $G\alpha_1$  y C-terminal de  $G\gamma_2$  se modificaron en puntos considerados clave por su implicación en la interacción directa con membranas lipídicas. De esta manera, se trató de determinar el efecto de tales modificaciones en la unión de las diferentes construcciones heterotriméricas a membranas de células Sf9.

#### ***Unión de complejos $G\alpha\beta\gamma$ , con mutaciones en la región N-terminal de $G\alpha_1$ , a membranas de células Sf9.***

En el capítulo 1 de esta tesis se aportaron importantes datos acerca de la interacción de diferentes formas de la proteína  $G\alpha_1$  con membranas de células Sf9 (figura 1-2-7 y tabla 1-2-2). Los cambios en  $G\alpha_1$  afectaron a su estado de acilación y, esto a su vez, influyó en su interacción con las membranas biológicas. Es importante tener en cuenta estos resultados relativos a los monómeros  $G\alpha_1$ , para poder entender mejor los resultados de interacción con membranas de esas mismas proteínas  $G\alpha_1$ , pero esta vez en presencia de  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$ .



**Figura 3-2-13. Efecto del dímero G $\beta\gamma$  en la unión de G $\alpha$ <sub>i1</sub> a membranas biológicas.** A, proporciones de unión de proteínas G $\alpha$ <sub>i1</sub> a membranas de células Sf9, expresadas en función de la cantidad de proteína G $\gamma$ <sub>2</sub> WT presente en las distintas fracciones de membranas totales ( $\mu$ g de proteína / ml de muestra). B, ídem, en función de la cantidad de proteína G $\beta$ <sub>1</sub> WT presente en las fracciones de membranas totales ( $\mu$ g de proteína / ml de muestra). C, representación en % del incremento en unión a membranas totales experimentado por cada proteína G $\alpha$ <sub>i1</sub> estudiada, como consecuencia de la coexpresión de las proteínas G $\beta$ <sub>1</sub> y G $\gamma$ <sub>2</sub> en células Sf9. Se representan los valores resultantes de aplicar la siguiente ecuación: [(unión promedio de G $\alpha\beta\gamma$  : unión promedio de G $\alpha$ ) x 100] - 100.

Así, el comportamiento de unión a membranas de las proteínas G $\alpha$ <sub>i1</sub> en presencia de G $\beta$  y G $\gamma$  fue muy parecido al que se observó en ausencia de ellas, con la diferencia de

que todas ellas fueron capaces de unirse en mayor proporción a membranas totales (figura 3-2-13). El incremento en unión, sin embargo, no fue el mismo en las diferentes proteínas  $G\alpha_1$ . Así, la que experimentó un mayor incremento en la proporción de unión fue la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$ , con un 37% de incremento medio, seguida de la proteína  $G\alpha_1 Pal^-$ , con un 23%, y, finalmente, la proteína  $G\alpha_1 WT$ , con un 18% (figura 3-2-13 C). Así pues, el dímero  $G\beta\gamma$  ejerció su mayor influencia sobre la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$ . En este sentido, hubo una correspondencia con los resultados de unión de  $G\alpha_1 Myr^-$  a membranas modelo, proteína que experimentó un considerable incremento en su capacidad para interactuar con dichas membranas como consecuencia de su unión al dímero  $G\beta\gamma$  (figuras 1-2-4, 1-2-5, 3-2-6 y 3-2-7).

La tabla 3-2-2 muestra los resultados de la interacción de las distintas proteínas  $G\alpha_1$ ,  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$ , coexpresadas en células Sf9, con membranas totales de dichas células. En dicha tabla se indicó la cantidad de cada tipo de proteína sobreexpresada que se repartió entre la fracción de membranas totales y la fracción citosólica.

Como ocurriera con las proteínas  $G\alpha_1 Pal^-$  y  $G\alpha_1 WT$ , sobreexpresadas sólo en células Sf9, las proporciones de unión a membranas totales de células Sf9 de estas mismas proteínas, en presencia de  $G\beta$  y  $G\gamma$ , fueron muy parecidas (figuras 3-2-13 y 3-2-14). Además, al igual que sucediera con la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$  sobreexpresada sólo, la unión de  $G\alpha_1 Myr^-$  a membranas, en presencia de  $G\beta$  y  $G\gamma$ , fue significativamente menor que la unión de las proteínas  $G\alpha_1$  miristoiladas (figura 3-2-14). No obstante, como ya se explicó anteriormente, la presencia del dímero  $G\beta\gamma$  contribuyó a la mayor interacción de  $G\alpha_1 Myr^-$  con membranas biológicas, reduciéndose así las diferencias de unión entre las proteínas  $G\alpha_1$  miristoiladas y la no miristoilada. Este último resultado puso de manifiesto, una vez más, el papel crítico del ácido mirístico en las interacciones de las proteínas G con membranas lipídicas.

A partir de los resultados representados en las figuras 3-2-13 y 3-2-14, se puede concluir que el cambio de un sólo aminoácido, la sustitución de la glicina N-terminal de la proteína  $G\alpha_1$  por la alanina, puede llegar a tener efectos relevantes en la transducción de la señal celular.

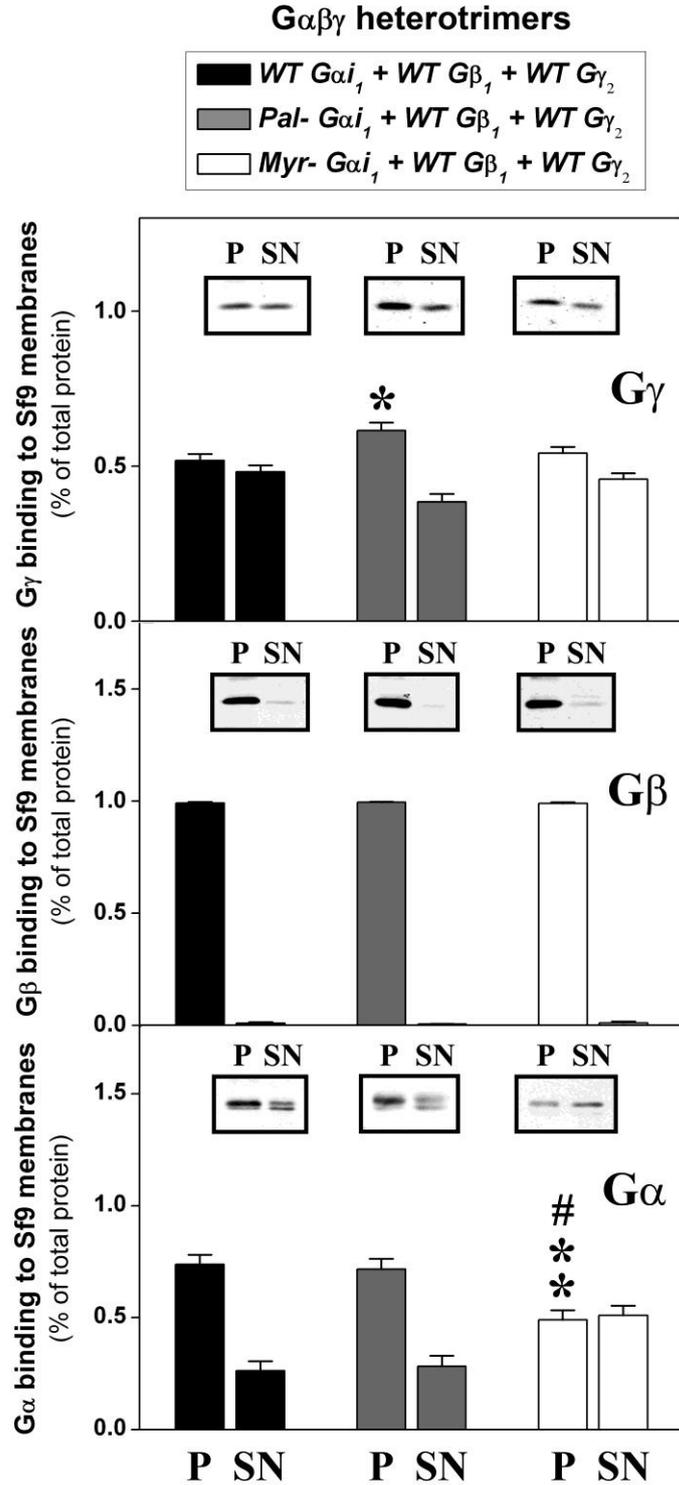
Por su parte, la proteína  $G\beta_1$  se localizó casi por completo en la fracción de membranas totales, al igual que ocurriera con la proteína  $G\beta_1$  sobreexpresada sólo en células Sf9 (figura 2-2-16). Esto tiene su explicación si tenemos en cuenta que la mayor parte de la proteína  $G\beta_1$ , sobreexpresada junto con  $G\alpha$  y  $G\gamma$ , no pudo interactuar con estas otras proteínas, puesto que sus niveles de expresión fueron muy superiores a los de

G $\alpha$ <sub>1</sub> y G $\gamma$ <sub>2</sub> (ver tabla 3-2-2). Esto pudo provocar un mal plegamiento de la proteína G $\beta$  y su posterior asociación a membranas.

Tabla 3-2-2. Unión de proteínas G $\alpha$ <sub>1</sub> WT, G $\alpha$ <sub>1</sub> Pal<sup>-</sup> y G $\alpha$ <sub>1</sub> Myr<sup>-</sup>, en presencia de G $\beta$ <sub>1</sub> y G $\gamma$ <sub>2</sub>, a membranas de células Sf9. Los resultados representan la cantidad total de cada proteína G recombinante sobreexpresada ( $\mu$ g / ml muestra)  $\pm$  E.E.M. (n=3) en las fracciones de membrana y citosol.

	<i>Subunidad</i>	<i>Localización en células Sf9</i>	
		<i>Membranas</i>	<i>Citosol</i>
<i>Heterotrónimo WT</i>	<i>G<math>\alpha</math><sub>1</sub> WT</i>	1,16 $\pm$ 0,18	0,59 $\pm$ 0,11
	<i>G<math>\beta</math><sub>1</sub> WT</i>	20,58 $\pm$ 3,25	0,11 $\pm$ 0,06
	<i>G<math>\gamma</math><sub>2</sub> WT</i>	0,97 $\pm$ 0,15	0,94 $\pm$ 0,17
<i>Heterotrónimo PAL<sup>-</sup></i>	<i>G<math>\alpha</math><sub>1</sub> PAL<sup>-</sup></i>	1,85 $\pm$ 0,24	0,97 $\pm$ 0,18
	<i>G<math>\beta</math><sub>1</sub> WT</i>	25,72 $\pm$ 3,16	0,07 $\pm$ 0,04
	<i>G<math>\gamma</math><sub>2</sub> WT</i>	1,29 $\pm$ 0,17	0,86 $\pm$ 0,15
<i>Heterotrónimo MYR<sup>-</sup></i>	<i>G<math>\alpha</math><sub>1</sub> MYR<sup>-</sup></i>	1,65 $\pm$ 0,19	1,81 $\pm$ 0,26
	<i>G<math>\beta</math><sub>1</sub> WT</i>	22,45 $\pm$ 4,29	0,12 $\pm$ 0,08
	<i>G<math>\gamma</math><sub>2</sub> WT</i>	1,12 $\pm$ 0,19	0,90 $\pm$ 0,18

La proteína G $\gamma$ <sub>2</sub> WT que se sobreexpresó conjuntamente con G $\alpha$ <sub>1</sub> WT, por un lado, y con G $\alpha$ <sub>1</sub> Myr<sup>-</sup>, por otro, se unió en ambos casos de un modo muy similar a membranas. En cambio, la unión de G $\gamma$ <sub>2</sub> WT, sobreexpresada junto con G $\alpha$ <sub>1</sub> Pal<sup>-</sup>, fue significativamente mayor que la unión descrita anteriormente, correspondiente a las otras proteínas G $\gamma$ <sub>2</sub> WT (figura 3-2-14).

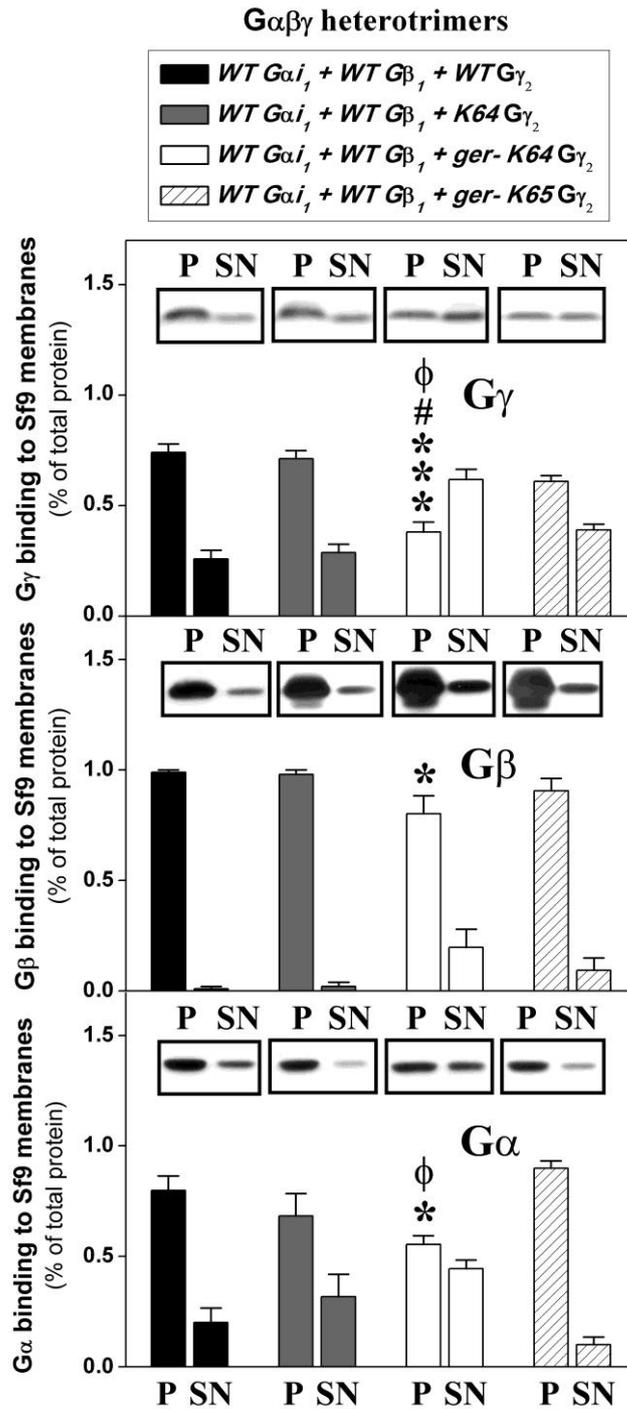


**Figura 3-2-14. Efecto del grado de acilación de  $G\alpha_i_1$  en la unión de proteínas  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  a membranas biológicas.** *Panel superior*, proporciones de unión de la proteína  $G\gamma_2$  WT a membranas de células Sf9. *Panel medio*, proporciones de unión de la proteína  $G\beta_1$  WT a membranas de células Sf9. *Panel inferior*, proporciones de unión de las proteínas  $G\alpha_i_1$  WT,  $G\alpha_i_1$  Pal<sup>-</sup> y  $G\alpha_i_1$  Myr<sup>-</sup> a membranas de células Sf9. Se representaron además los E.E.M. (n=3). Se muestran “immunoblots” representativos de cada experimento de unión. \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ . “#” indica la existencia de diferencias significativas en la unión de  $G\alpha_i_1$  Myr<sup>-</sup> a membranas totales, respecto a la unión de la proteína  $G\alpha_i_1$  Pal<sup>-</sup>.

***Unión de complejos  $G\alpha\beta\gamma$ , con mutaciones en la región C-terminal de  $G\gamma_2$ , a membranas de células Sf9.***

Si en la anterior sección se estudió la unión a membranas de diferentes proteínas  $G\alpha_i_1$ , sobreexpresadas junto con las proteínas  $G\beta_1$  *WT* y  $G\gamma_2$  *WT*; en esta sección, se estudiaron las propiedades de interacción de diferentes proteínas  $G\gamma_2$ , con mutaciones en su región C-terminal, las cuales fueron sobreexpresadas junto con las proteínas  $G\alpha_i_1$  *WT* y  $G\beta_1$  *WT*. De todas las proteínas  $G\gamma_2$  estudiadas, la unión de la proteína  $G\gamma_2$  *ger<sup>-</sup> K64* a membranas de células Sf9 fue significativamente menor que la unión de las restantes proteínas  $G\gamma_2$  (figura 3-2-15). Las mutaciones en los aminoácidos lisina-64 y cisteína-68 del extremo C-terminal de la proteína  $G\gamma_2$  tuvieron importantes efectos en la unión a membranas de las proteínas  $G\beta_1$  y  $G\alpha_i_1$  coexpresadas con  $G\gamma_2$  *ger<sup>-</sup> K64*. Como consecuencia de esa coexpresión proteica, se incrementó de manera significativa la proporción de las proteínas  $G\beta_1$  y  $G\alpha_i_1$  en las fracciones citosólicas (figura 3-2-15). En el caso concreto de la proteína  $G\alpha_i_1$  coexpresada con  $G\gamma_2$  *ger<sup>-</sup> K64*, la unión de dicha proteína fue significativamente menor que la de  $G\alpha_i_1$  coexpresada con  $G\gamma_2$  *WT* y, curiosamente, que la unión de  $G\alpha_i_1$  coexpresada con  $G\gamma_2$  *ger<sup>-</sup> K65*, pero no hubo diferencias significativas con respecto a la unión a membranas de  $G\alpha_i_1$  coexpresada con  $G\gamma_2$  *K64* (figura 3-2-15).

La sólo mutación de lisina-64 a glicina (*K64G*) en la región C-terminal de  $G\gamma_2$  apenas modificó los perfiles de unión de los distintas subunidades formadoras del complejo trimérico mutado, con respecto a los perfiles de las subunidades  $G\alpha_i_1$ ,  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$  formadoras del complejo no mutado. En este estudio, los mayores valores de interacción con membranas de células Sf9 correspondieron a estas dos construcciones heterotriméricas. En un lugar intermedio entre estos complejos y el complejo con la mayor pérdida en capacidad de interacción, constituido por la proteína  $G\gamma_2$  *ger<sup>-</sup> K64*, se situó el complejo heterotrimérico constituido por la proteína  $G\gamma_2$  *ger<sup>-</sup> K65*.



**Figura 3-2-15. Efecto de mutaciones en la región C-terminal de G $\gamma_2$  en la unión de proteínas G $\alpha_i\beta_1\gamma_2$  a membranas biológicas.** *Panel superior*, proporciones de unión de las proteínas G $\gamma_2$  WT, G $\gamma_2$  K64, G $\gamma_2$  ger<sup>-</sup> K64, y G $\gamma_2$  ger<sup>-</sup> K65 a membranas de células Sf9. *Panel medio*, proporciones de unión de la proteína G $\beta_1$  WT a membranas de células Sf9. *Panel inferior*, proporciones de unión de la proteína G $\alpha_i$  WT a membranas de células Sf9. \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p < 0,05$ . “#” indica la existencia de diferencias significativas en la unión de G $\alpha_i$  WT + G $\beta_1$  WT + G $\gamma_2$  ger<sup>-</sup> K64 a membranas totales, respecto a la unión de G $\alpha_i$  WT + G $\beta_1$  WT + G $\gamma_2$  K64. “ $\phi$ ” indica la existencia de diferencias significativas en la unión de G $\alpha_i$  WT + G $\beta_1$  WT + G $\gamma_2$  ger<sup>-</sup> K64 a membranas totales, respecto a la unión de G $\alpha_i$  WT + G $\beta_1$  WT + G $\gamma_2$  ger<sup>-</sup> K65.

Al igual que el ácido mirístico unido a la proteína  $G\alpha_1$ , el resto geranilgeraniol unido a la proteína  $G\gamma_2$  condicionó fuertemente la interacción con membranas de las proteínas  $G\gamma_2$  sobreexpresadas solas y de los dímeros  $G\beta\gamma$  (figuras 2-2-7, 2-2-16 y 2-2-17), así como también la de los complejos heterotrímeros. Su ausencia supuso la pérdida de la capacidad de los distintos integrantes del complejo heterotrimérico para interactuar con membranas biológicas, aunque en distinto grado según que el aminoácido básico alterado en la región más próxima de  $G\gamma_2$  fuera lisina-64 o lisina-65 (figura 3-2-15). Estos resultados pusieron de manifiesto, una vez más, la importancia clave de las regiones adyacentes a los puntos donde se sitúan los grupos lipídicos anclados a las proteínas G, en las interacciones de proteínas G con membranas lipídicas.

## Capítulo 4

### DISCUSIÓN GENERAL

#### 4.1. Interacciones entre la proteína $G\alpha_i$ y las membranas lipídicas.

El presente estudio investiga las bases moleculares de la interacción de proteínas Gi heterotriméricas y sus formas (monómero y dímero) con membranas. Para ello, se han realizado mutaciones puntuales únicas y combinadas y se ha comparado su unión a membranas biológicas y membranas modelo que simulan diferentes dominios de membrana. Durante las próximas páginas discutiremos los resultados mostrados en capítulos anteriores, comenzando por la forma más sencilla de proteína Gi, el monómero alfa, y siguiendo con niveles crecientes de complicación.

El ácido mirístico está unido, por medio de un enlace amida, a la glicina aminoterminal de proteínas  $G\alpha$  de la familia Gi, así como de las proteínas transducina y gusducina (Escribá et al, 2007). Esta modificación lipídica es crítica por muchos motivos: por un lado, es necesaria para que puedan interaccionar con las membranas biológicas todas aquellas proteínas  $G\alpha$  susceptibles de miristoilarse (Jones et al, 1990). Además, su ausencia provoca su desestabilización estructural (Medkova et al, 2002) y funcional (Taussig et al, 1993; Wilson and Bourne, 1995). También juega un papel muy importante favoreciendo la incorporación de ácido palmítico en la cisteína contigua, con todo lo que ello conlleva (Duncan and Gilman, 1996; Jones et al, 1997).

Nuestros resultados en estudios de unión a membranas biológicas y a membranas modelo corroboran la hipótesis expuesta acerca del papel crítico del ácido mirístico en la interacción de determinadas proteínas  $G\alpha$  con membranas lipídicas, en la línea de los estudios pioneros acerca de la termodinámica de la interacción de péptidos miristoilados con membranas modelo (Peitzsch and McLaughlin, 1993). De hecho, su ausencia en la proteína  $G\alpha_i$  reduce de forma dramática la unión de esta proteína a diferentes tipos de membranas y elimina las preferencias de esta proteína por diferentes estructuras lipídicas.

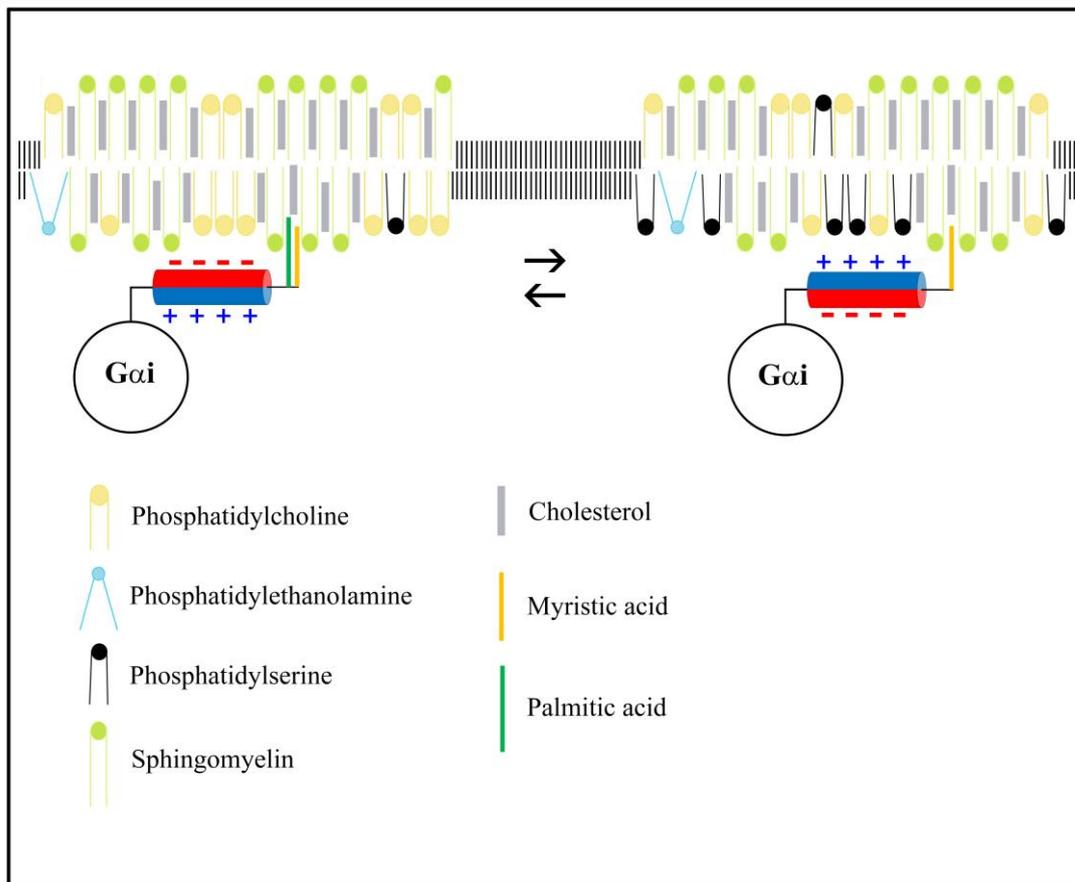
Algunos estudios indican que la incorporación a una proteína miristoilada de un segundo grupo lipídico, como el ácido palmítico, no sólo aporta mayor estabilidad

termodinámica a la proteína en su interacción con membranas (Bhatnagar and Gordon, 1997; Fishburn et al, 1999), sino que también parece que condiciona el destino de la proteína palmitoilada en su trayecto por las membranas biológicas (Morales et al, 1998; Resh, 1999; Moffet et al, 2000). La palmitoilación de proteínas es un fenómeno reversible (Degtyarev et al, 1994), cuya trascendencia funcional empieza ahora a vislumbrarse (Bijlmakers and Marsh, 2003; Aicart-Ramos et al-2011). En este trabajo se presentan resultados que arrojan más luz acerca del papel clave del ácido palmítico en el contexto de las interacciones lípido-proteína.

La proteína  $G_{\alpha i}$  muestra una mayor predisposición a interactuar con lípidos con alta propensión lamelar, como PC, y tiene una afinidad significativamente menor por dominios ricos en PE y PS. El comportamiento del monómero alfa indica que el ácido palmítico influye decisivamente en la localización de la proteína en dominios pobres en PE y PS. Curiosamente, estos dos tipos de fosfolípidos son los más abundantes en la monocapa interna de la membrana plasmática (Rothman and Lenard, 1977), lugar por el que se mueve la proteína  $G_{\alpha}$  heterotrimérica durante el proceso de transducción de señal. Estos resultados confirman y extienden los modelos descritos en trabajos anteriores, que tratan de explicar el comportamiento de la proteína G transductora de señal en el momento de su interacción con los lípidos de la membrana (Escribá et al, 1995; Escribá et al, 1997; Vögler et al, 2004; Barceló et al, 2007). Este nuevo enfoque se hace cada vez más necesario a la luz de los recientes descubrimientos que ponen de manifiesto la heterogeneidad lateral de las membranas biológicas, en las que aparecen dominios con composición lipídica y proteica que difiere de zonas adyacentes (Simons and Ikonen, 1997; Vereb et al, 2002; Escribá, 2006; Klemm et al, 2008; Lingwood and Simons, 2009; Lingwood and Simons, 2010). Los lípidos de la membrana dejan de ser considerados simples elementos de soporte y de separación en estos modelos más completos, alejados de los modelos centrados exclusivamente en las proteínas (Escribá, 2006).

La palmitoilación de la proteína  $G_{\alpha i}$  parece estar asociada a un estado inactivo de la misma (Degtyarev et al, 1994; Duncan and Gilman, 1996). Por otro lado, hemos observado que la miristoilación es crítica para la unión de  $G_{\alpha i_1}$  a las bicapas lipídicas, mientras que la palmitoilación aumenta la afinidad por dominios lamelares y reduce la afinidad por dominios cargados negativamente. De acuerdo con todo lo anterior, proponemos un modelo que relaciona el estado funcional de la proteína  $G_{\alpha i}$  con el importante papel regulador del ácido palmítico y de los lípidos de membrana en la

organización de la transducción de señales. A la luz de este modelo, una proteína  $G\alpha_i$  palmitoilada se dirigiría hacia dominios de la membrana plasmática con un mayor ordenamiento lipídico y una menor abundancia en PE y PS, alejados de la proteína efectora correspondiente (figura 4-1). Esta visión de la organización funcional de proteínas G en la membrana encaja con el patrón de distribución punteado de la proteína  $G\alpha_i$  observado en células *MA104*, obtenidas a partir de riñón del mono Rhesus (Huang et al, 1999). De hecho, numerosos trabajos ponen de manifiesto la colocación y el cofraccionamiento de proteínas  $G\alpha$  en una conformación inactiva con la caveolina-1, el principal componente proteico de las membranas caveolares (Li et al, 1995; Huang et al, 1999; Galbiati et al, 1999; Dunphy et al, 2001). Se ha observado, incluso, la interacción directa de proteínas  $G\alpha$  con la región amino-terminal de la caveolina (Li et al, 1995).



**Figura 4-1. Modelo de interacción entre la proteína  $G\alpha_i$  y los lípidos de membrana.** El ácido palmítico constituye un elemento regulador clave de la localización de la proteína transductora  $G\alpha_i$  en los diferentes dominios de tipo “raft” de la membrana plasmática. Así, dominios lipídicos de tipo “raft” con mayor proporción de PS serían el destino principal de una proteína  $G\alpha_i$  miristoilada, mientras que la palmitoilación proteica la alejaría de aquéllos, y la conduciría hacia dominios de tipo “raft” con una menor proporción de PS.

La palmitoilación de la proteína  $G\alpha_i$  podría constituir un punto crítico en la regulación de su actividad. Puesto que el grado de acilación de  $G\alpha_i$  determina la localización de la proteína en unos u otros dominios de membrana, los fenómenos de palmitoilación y depalmitoilación estarían de este modo condicionando la interacción de  $G\alpha_i$  con diferentes proteínas reguladoras de su actividad (Li et al, 1995; Wedegaertner et al, 1995; Wilson and Bourne, 1995; Tu et al, 1997).

La asociación persistente de proteínas  $G\alpha$  con la membrana plasmática, incluso tras la activación de la proteína, ya sin el ácido palmítico unido, refleja la existencia de otras partes de la proteína importantes en la interacción con membranas (Huang et al, 1999). Así, la proteína  $G\alpha_i$  porta en su extremo amino una molécula de ácido mirístico. Este resto lipídico, por sí sólo, no confiere a la proteína la suficiente hidrofobicidad como para permitir su asociación estable con la membrana plasmática (Peitzsch and McLaughlin, 1993; Bhatnagar and Gordon, 1997). Se ha demostrado que otras proteínas de membrana miristoiladas, como pp60<sup>src</sup> (Src) y MARCKS, tienen un motivo de unión a membrana consistente en la combinación de un grupo miristoílo y un dominio de residuos básicos (Sigal et al, 1994; Seykora et al, 1996). En el caso concreto de Src, las energías de unión a membrana de las componentes hidrofóbica y electrostática de su extremo amino, consideradas individualmente, no permiten el anclaje firme de la proteína a la membrana. Pero la combinación de ambas componentes en un motivo de unión a membranas en el extremo amino de la proteína, sí que permite su asociación estable a membranas (Buser et al, 1994). De la misma manera, en las proteínas  $G\alpha$  existe un “parche” o motivo de residuos básicos en la hélice alpha amino-terminal, próxima al punto donde se produce la acilación (figura 1-2-8; Kosloff et al, 2002).

Se ha comprobado que la hélice alpha amino-terminal de la proteína transductora  $G\alpha$  juega un papel importante en la interacción de dicha proteína con membranas lipídicas (Busconi et al, 1997; Busconi and Denker, 1997). Y más concretamente, los aminoácidos básicos localizados en esa estructura (Pedone & Hepler, 2007).

La presencia de un parche de aminoácidos básicos altamente conservados en la hélice alpha amino-terminal de la proteína  $G\alpha_i$  (figura 1-2-8), hace pensar que también la componente electrostática juega un papel clave en la interacción de esta proteína con las membranas biológicas. Estudios de unión a membranas modelo de una proteína  $G\alpha$  miristoilada sin la hélice alpha amino-terminal, ponen de manifiesto la incapacidad del ácido mirístico para inducir, por sí sólo, el anclaje de la proteína de señalización a estas vesículas (Busconi and Denker, 1997). Esos resultados y los que nosotros presentamos

aquí, plantean la necesidad de revisar algunos modelos explicativos acerca de la interacción de proteínas G con membranas biológicas. La posibilidad de un tercer mecanismo de “targeting” asociado a una proteína  $G\alpha$  miristoilada, ha sido contemplada por algunos autores y permitiría explicar la permanencia en la membrana plasmática de proteínas  $G\alpha$  N-miristoiladas y activadas, en ausencia de ácido palmítico unido y del dímero  $G\beta\gamma$  más hidrofóbico (Fishburn et al, 1999; Huang et al, 1999). Así, la depalmitoiloación de la proteína  $G\alpha_i$ , tras la activación previa del receptor, podría conducir a una reorganización estructural de dicha proteína, de manera que se produciría un cambio en la disposición relativa de aminoácidos con carga, situados cerca del lugar de acilación, como consecuencia de la rotación de la hélice  $\alpha$  N-terminal. La proteína  $G\alpha_i$  miristoilada, en una conformación activa, se movería por la membrana hacia dominios donde hubiera un mayor enriquecimiento en PS (figura 4-1). Se ha visto que los *lipid rafts* contienen cantidades inusuales de PS y de plasmalógenos de etanolamina (Pike et al, 2002). Este tipo de dominios lamelares podría ser el destino preferido de una proteína  $G\alpha_i$  miristoilada activada, sin palmítico, en busca de su proteína efectora (Vögler et al, 2004; Escribá, 2006). La palmitoiloación de la proteína implicaría una nueva rotación de la hélice  $\alpha$  N-terminal, que provocaría que aminoácidos aniónicos quedaran orientados hacia la superficie de la membrana, condicionando de esta manera la preferencia de la proteína  $G\alpha_i$ , palmitoilada y miristoilada, por zonas de la membrana sin carga y con un alto ordenamiento lipídico (figura 4-1).

Por su parte, el dímero  $G\beta\gamma$ , del que se habría disociado previamente la proteína  $G\alpha$  como consecuencia de la activación del receptor y del complejo heterotrimérico, se movería preferencialmente hacia dominios tendentes a adoptar una estructura de tipo no lamelar (figura 4-2; Vögler et al, 2004).

En síntesis, parece claro que las modificaciones lipídicas que sufren las proteínas monoméricas  $G\alpha$  son decisivas para su asociación a membranas biológicas, determinan el destino de tales proteínas por el interior de la célula y su movilidad por la superficie de las membranas celulares.

Nuestros estudios acerca de la interacción de proteínas  $G\alpha_i$  con membranas de células Sf9 indican que el ácido mirístico es crítico en la interacción proteína-membrana, de acuerdo con otros trabajos anteriores (Jones et al, 1990). En este sentido, el ácido palmítico no es tan crucial, si bien parece claro que su presencia confiere a la proteína una asociación a membranas más estable (Peitzsch and McLaughlin, 1993; Morales et

al, 1998; Fishburn et al, 1999; Fishburn et al, 2000). Estos resultados refuerzan la idea de que el ácido mirístico determina la unión de  $G\alpha_i$  a membranas, y el ácido palmítico regula el movimiento de la proteína entre dominios de membrana.

Hoy en día parece incuestionable que los ciclos de palmitoilación y depalmitoilación de proteínas  $G\alpha$  constituyan un elemento regulador clave en el proceso de transducción de señal. La palmitoilación de proteínas es un fenómeno reversible, catalizado enzimáticamente por protein palmitoil-transferasas, del que se desconocen aún muchos detalles. Se ha visto que estas enzimas responsables de la palmitoilación de proteínas son proteínas integrales de membrana (Bijlmakers and Marsh, 2003). Una actividad palmitoil-transferasa capaz de palmitoilar proteínas  $G\alpha$  ha sido detectada en fracciones de la membrana plasmática de baja densidad, enriquecidas también en caveolina, esfingomielina y colesterol (Dunphy et al, 2001). Estos resultados parecen indicar que el enzima responsable de la palmitoilación de proteínas  $G\alpha$  se halla localizado predominantemente en dominios de tipo “raft”. Un mejor conocimiento de la biología de un proceso tan dinámico como es la palmitoilación de proteínas, sin duda nos permitirá desvelar al mismo tiempo claves fundamentales del complejo proceso de transducción de señal.

#### **4.2. Caracterización de las interacciones del dímero $G\beta_1\gamma_2$ con membranas lipídicas.**

El heterodímero  $G\beta_1\gamma_2$  es un complejo constituido por dos subunidades que interaccionan fuertemente entre sí y cuya disociación sólo es posible bajo condiciones desnaturalizantes (Wall et al, 1995; Neer et al, 1996). La elucidación de la estructura del heterotrímero  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  mediante la técnica de difracción de rayos X, no permitió definir con exactitud la estructura del complejo en la región en la que interacciona con los lípidos de la membrana (Wall et al, 1995), región correspondiente a los dominios lipídicos de las proteínas  $G\alpha_i$  y  $G\gamma_2$ . La estructura del geranylgeraniol de la subunidad  $G\gamma_2$  es muy diferente a la de los dos ácidos grasos saturados de la subunidad  $G\alpha_i$  (figura 4-2) y la presencia de unos y otros lípidos condiciona enormemente el microdominio de membrana donde se ubicarán finalmente y, por ello, las proteínas de señalización con las que estas “promiscuas” proteínas van a interaccionar (Escribá et al, 1997; Vögler et al, 2004).

Importantes trabajos han descrito el destacado papel modulador que tiene el lípido isoprenoide sobre la estructura lipídica en membranas modelo (Funari et al, 2005; Barceló et al, 2007). Su presencia en la proteína  $G\gamma$  es crucial para que se pueda producir el anclaje del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  a membranas lipídicas, tal y como se ha comprobado en esta tesis (figura 2-2-6), y como ya habían demostrado previamente otros autores (Muntz et al, 1992). Así, el extremo carboxi-terminal de la proteína  $G\gamma_2$  que lleva unido el resto de geranylgeraniol, constituye un punto crítico en el análisis de la interacción  $G\beta\gamma$ -membranas lipídicas. La escasa hidrofobicidad de este complejo y, por extensión, de las distintas proteínas G heterotriméricas, revela el papel destacado de los extremos N-terminal de  $G\alpha$  y C-terminal de  $G\gamma$  en la interacción con membranas, al ser en esos puntos donde se concentra principalmente la componente hidrofóbica.

La forma ramificada del lípido isoprenoide pone de manifiesto otra característica esencial, como es la capacidad que este lípido le confiere al complejo heterodimérico para interactuar preferencialmente con lípidos pro-no lamelares, tales como PE, tal y como se ha demostrado en este trabajo. Las regiones de membrana enriquecidas en este tipo de lípidos presentan una presión lateral superficial baja que permite el alojamiento de estructuras relativamente voluminosas, como el geranylgeraniol (figura 4-2). En regiones con elevada presión lateral (es decir, con empaquetamiento denso en la superficie de la bicapa lipídica), como por ejemplo los “lipid raft”, es difícil alojar los lípidos isoprenoides, mientras que los ácidos grasos saturados (por ejemplo, ácidos mirístico y palmítico) pueden integrarse más fácilmente (Escribá et al, 1997; Vögler et al, 2004). A este papel director del lípido isoprenoide en la interacción  $G\beta\gamma$ -membranas lipídicas, hay que añadir el rol crucial del dímero  $G\beta\gamma$  determinando el destino del heterotrímero  $G\alpha\beta\gamma$  hacia dominios de membrana de tipo no lamelar (Escribá et al, 1997; Vögler et al, 2004).

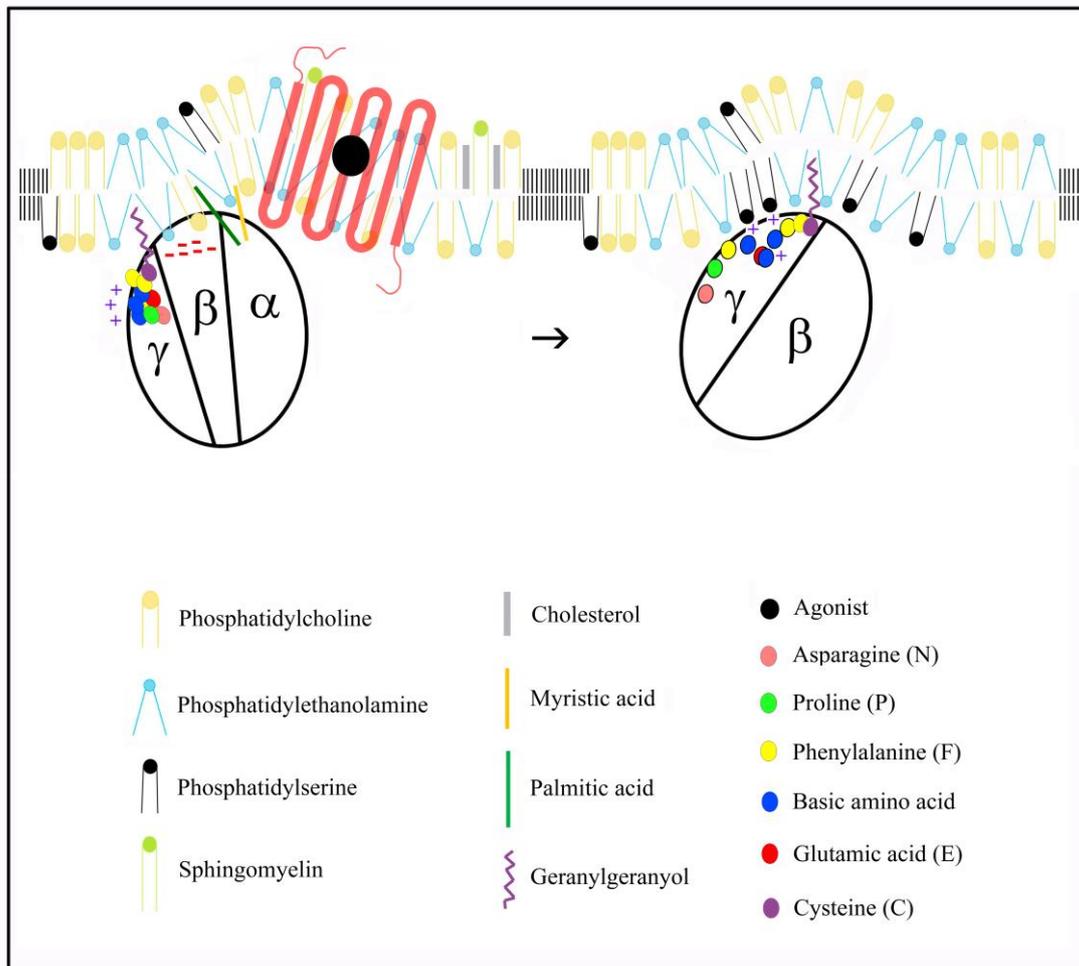
En este trabajo se demuestra también el papel cooperativo de ciertos aminoácidos situados en la cercanía del lípido isoprenoide, modulando en conjunto la interacción del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  con membranas biológicas (Murray et al, 2001; Hessel et al, 2003). A partir de un diseño experimental basado en los análisis de secuencia y estructura del dominio C-terminal de  $G\gamma_2$  donde se localiza el resto geranylgeraniol (figuras 2-1-2 y 2-2-1), se identificaron los aminoácidos básicos que promueven la interacción del heterodímero  $G\beta_1\gamma_2$  con los lípidos aniónicos de las membranas lipídicas. Estos aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína  $G\gamma_2$  fueron: *Arg-62*, *Lys-64* y *Lys-65*. La mutación de estos tres aminoácidos a glicina provocó que la unión del dímero  $G\beta_1\gamma_2$

a membranas de tipo PC:PS (4:1) no fuera significativamente mayor que a membranas de PC (figuras 2-2-6 y 2-2-12). Estos resultados demuestran que los tres aminoácidos con carga neta positiva intervienen en la interacción con fosfolípidos con carga neta negativa de la membrana. Nuestros resultados demuestran, además, que estos aminoácidos juegan un papel estructural clave en las interacciones G $\beta\gamma$ -membrana lipídica (figura 4-3).

Los tres aminoácidos básicos actúan conjuntamente con el lípido isoprenoide, confiriéndole al heterodímero una notable propensión para interaccionar con dominios ricos en PE (figura 2-2-8) y, en mayor grado incluso, con dominios ricos en PE y PS (figura 2-2-14). PE y PS son dos fosfolípidos especialmente abundantes en la cara interna de la membrana plasmática (Rothman & Lenard, 1977). Una prueba de esa cooperatividad entre el lípido isoprenoide y los aminoácidos con carga positiva cercanos al geranilgeraniol, nos la aportan los datos de interacción de dímeros G $\beta_1\gamma_2$ , mutados en esos aminoácidos, con membranas modelo. Hemos visto que los aminoácidos *Arg-62*, y especialmente *Lys-65*, condicionaron fuertemente la tendencia del heterodímero a unirse a dominios ricos en PE (figuras 2-2-8 y 4-3). Su sustitución por glicina provocó la pérdida de la capacidad del complejo G $\beta_1\gamma_2$  para unirse a dominios con lípidos con propensión no lamelar, preferentemente ricos en PE y PS (figuras 2-2-9, 2-2-10, 2-2-14 y 4-3). Por su parte, la sustitución de *Lys-64* por glicina no alteró de una manera drástica el perfil de interacción de G $\beta_1\gamma_2$  con membranas modelo, tomando como referencia la unión del dímero “*wild type*” (figura 2-2-6 y 4-3).

Este singular comportamiento de los complejos G $\beta_1\gamma_2$  con mutaciones en esos aminoácidos básicos de la región C-terminal, especialmente en los casos de mutaciones sencillas, revela una organización estructural peculiar de esos aminoácidos básicos en el momento en que se produce la interacción del heterodímero con membranas lipídicas. Los estudios de difracción de rayos X (Wall et al, 1995) no aclaran del todo esta cuestión, aportando estructuras en base a modelos de organización incompletos, en los que falta alguna parte de la proteína, e incluso los lípidos de la membrana.

El programa de predicción estructural *PSIPRED*, aplicado en este estudio (figura 4-4 A), viene a confirmar lo que ya se sabía a partir de la técnica de difracción de rayos X.

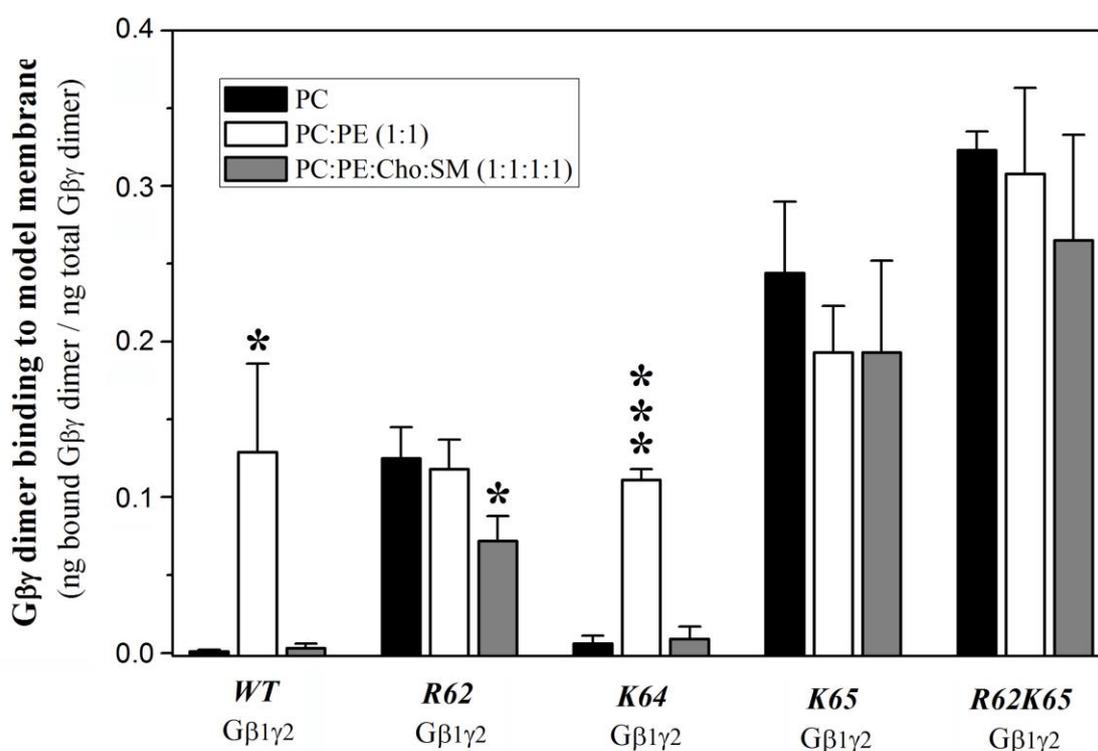


**Figura 4-2. Modelo de interacción con membranas lipídicas de un complejo  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ , situado en la proximidad de un receptor heptahelicoidal, y del dímero  $G\beta_1\gamma_2$ , libre tras la activación del trímero.** El heterodímero  $G\beta_1\gamma_2$  adoptaría una conformación diferente en su región C-terminal en contacto con la membrana lipídica, tras su disociación de la proteína  $G\alpha_1$ . Este reordenamiento posibilitaría su migración hacia regiones de la membrana con alta propensión a adoptar una organización estructural de tipo no lamelar, en la que se localizarían también lípidos aniónicos como PS.

El resultado de la simulación muestra una región C-terminal de la proteína  $G\gamma_2$  con una estructura desorganizada, sin un patrón regular de organización espacial (“random coil”). Nuestros resultados permiten, por el contrario, hipotetizar sobre un estado conformacional transitorio distinto en el extremo C-terminal de  $G\gamma_2$ , condicionado por la presencia de lípidos de membrana en su vecindad. Así, los aminoácidos *Arg-62* y *Lys-65* quedarían situados muy próximos a la superficie polar de la membrana lipídica, cerca del resto geranylgeraniol. *Lys-64* quedaría, en cambio, más alejada de la superficie de la membrana, de acuerdo con una disposición que podría corresponder a una vuelta de una pequeña hélice  $\alpha$  (figura 4-2). La proyección de esa hélice  $\alpha$  en un plano bidimensional refleja una disposición relativa de los tres aminoácidos básicos dentro de la hélice que estaría de acuerdo con el modelo aquí planteado (figura 4-4 B). Más

aminoácidos de esa región C-terminal podrían estar formando parte de la hélice  $\alpha$  propuesta, dada la presencia de aminoácidos hidrofóbicos próximos que podrían quedar orientados hacia la membrana, y de aminoácidos polares que quedarían orientados hacia el lado citosólico (figura 4-2).

El papel tan destacado que juegan los aminoácidos *Arg-62* y *Lys-65*, posibilitando que el complejo  $G\beta\gamma$  se dirija hacia regiones con fosfolípidos con propensión no lamelar, se ve aún más reforzado por el comportamiento opuesto del dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *R62K65* en presencia de membranas modelo. Este dímero pierde su capacidad para interactuar preferencialmente con dominios de PE, siendo capaz de interactuar con estructuras con alta propensión lamelar en mucho mayor grado que el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  *WT* (figura 4-3).



**Figura 4-3. Los aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$  son determinantes clave de la interacción con microdominios lipídicos de diferente organización estructural.** Los aminoácidos *Arg-62* y *Lys-65* de  $G\gamma_2$  condicionaron fuertemente el perfil de interacción de todo el dímero  $G\beta_{1\gamma_2}$  con membranas lipídicas. La mutación en alguno de ellos implicó una pérdida de la unión preferencial a vesículas ricas en PE. Más aún, provocó un aumento notable de la afinidad del dímero por dominios de elevado ordenamiento y baja propensión a formar estructuras de tipo no lamelar. El mayor incremento en la afinidad por microdominios con estructura  $L_0$  se dio en el dímero con los aminoácidos *Arg-62* y *Lys-65* mutados a glicina.

Este tipo de motivos constituidos por un resto isoprenoide, situado próximo a un parche de aminoácidos básicos, constituyen una señal de unión específica a membrana plasmática, predominante entre varias subfamilias del grupo de pequeñas proteínas G



dominios ricos en PE y PS (figura 4-2). Bajo determinadas condiciones, PS podría llegar a formar parte de dominios con propensión a formar estructuras no lamelares (Hope & Cullis, 1979; Kirk et al, 1984; Matsuzaki et al, 1998). Su interacción con los aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$ , su consiguiente proximidad al lípido isoprenoide tendente a alojarse en zonas de baja presión lateral superficial (Funari et al, 2005; Barceló et al, 2007), y el enriquecimiento de estos dominios en lípidos pro-no lamelares como PE (Escriba, 2006), posibilitarían la concentración de lípidos aniónicos como PS en estas regiones con alta propensión no lamelar.

El comportamiento del dímero  $G\beta\gamma$ , en su migración como tal complejo por la superficie de las membranas lipídicas, tiene gran relevancia desde un punto de vista estructural y funcional. La heterogeneidad estructural en el plano lateral de las membranas biológicas contribuye a una mayor eficiencia en la propagación del mensaje por la superficie de la célula, respecto a un modelo basado en el movimiento estocástico de los componentes del sistema de transducción de señales. Como resultado de tal organización, proteínas con afinidades lipídicas similares se ubican próximas entre sí. Esta eficiencia para la transmisión de señales contribuye a importantes funciones del dímero  $G\beta\gamma$ , regulando procesos fundamentales como el crecimiento y la supervivencia celulares (Stephens et al, 1997; Schwindinger & Robishaw, 2001; Tang et al, 2011).

#### **4.3. Interacciones del heterotrímero $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ con las bicapas lipídicas.**

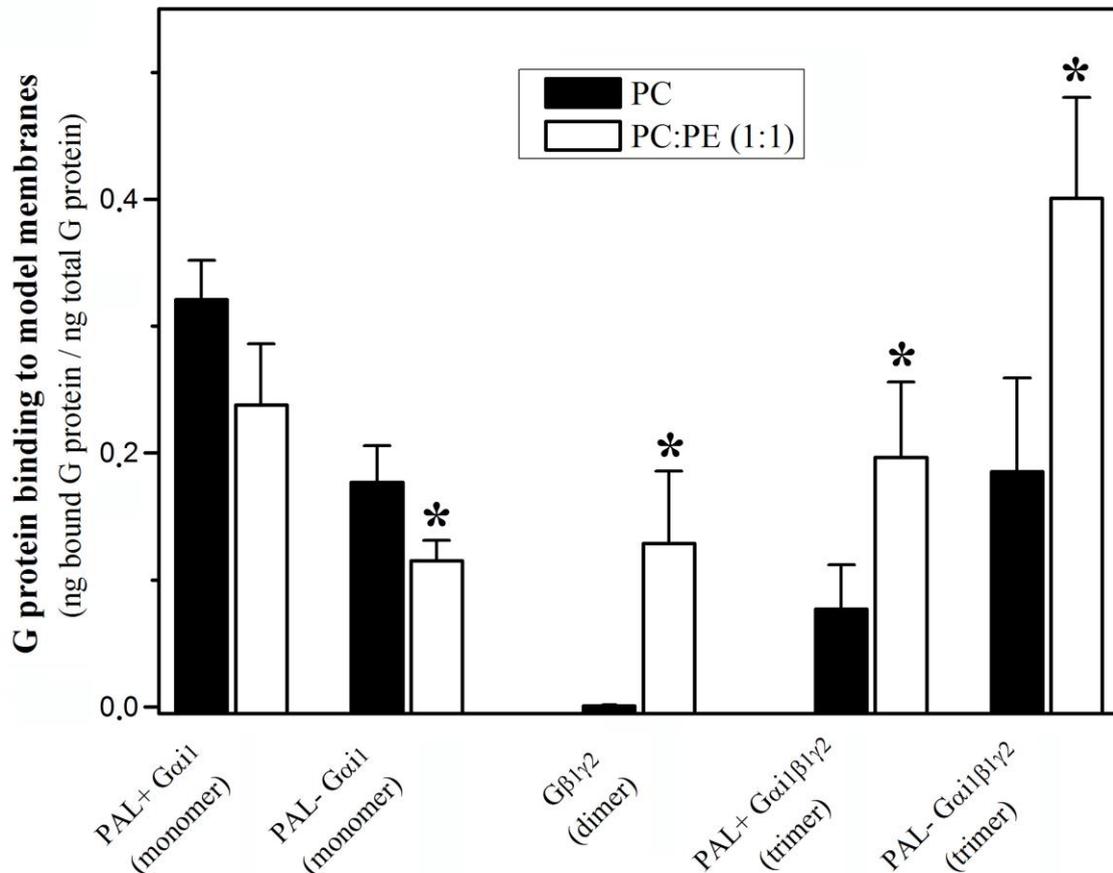
La relevancia del dímero  $G\beta\gamma$  para la interacción de  $G\alpha$  con membranas lipídicas ha sido puesta de manifiesto en numerosos trabajos (Sternweis, 1986; Fishburn et al, 1999; Evanko et al, 2000; Fishburn et al, 2000). De hecho, durante largo tiempo se pensó que su única función era la de actuar como modulador de la localización y actividad de la proteína  $G\alpha$  dentro de la célula.

A la luz de los nuevos modelos estructurales propuestos para las membranas biológicas (Escribá et al, 1997; Vereb et al, 2003, Escribá et al, 2008), el dímero  $G\beta\gamma$  ha pasado de ser considerado un elemento clave para el anclaje de la proteína  $G\alpha$  a membranas biológicas, a convertirse en el elemento clave que determina la localización concreta de la proteína  $G\alpha$  en la membrana plasmática, dentro de determinados dominios lipídicos (Vögler et al, 2004; Barceló et al, 2007). En este trabajo, se investiga

el papel relativo de  $\alpha$  y  $\beta\gamma$ , contribuyendo a esclarecer las bases moleculares de la interacción del complejo trimérico con las membranas lipídicas.

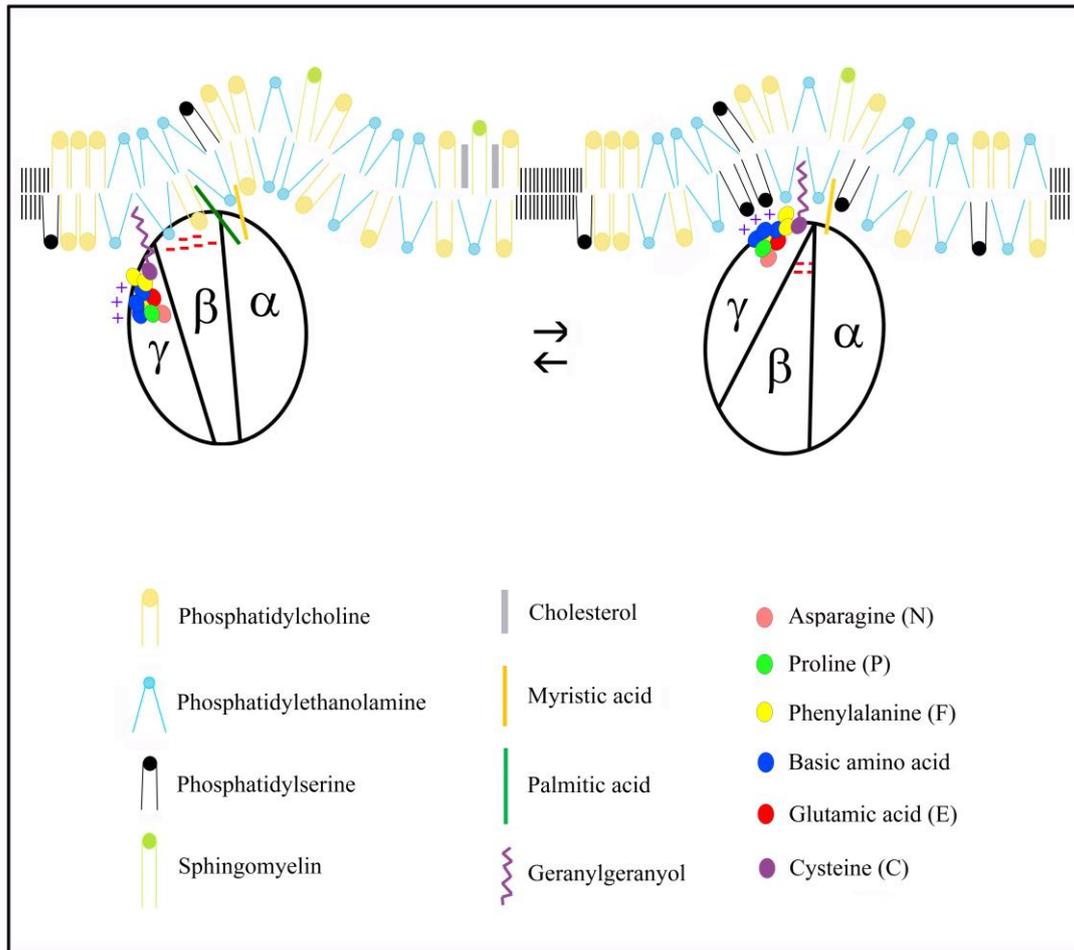
Un resultado muy destacado es el que se refiere a la interacción con dominios constituidos por lípidos con propensión no lamelar. Como ya se había visto en un trabajo precedente, el dímero  $G\beta\gamma$  era capaz de revertir el comportamiento del monómero  $G\alpha$  en su interacción con membranas lipídicas modelo, conduciéndolo de regiones de alto ordenamiento lipídico ( $L_o$ ) hacia regiones de mayor desorden ( $L_d$ ), caracterizadas por manifestar una importante tensión de curvatura (Vögler et al, 2004). Se ha podido demostrar que esto ocurre tanto con el heterotrímico constituido por una subunidad  $\alpha$  miristoilada y palmitoilada, como con aquél constituido por una proteína  $G\alpha$  únicamente miristoilada (figura 4-5). La principal diferencia en el comportamiento de estos dos complejos radica en el tipo de interacción que tiene lugar con el lípido aniónico fosfatidilserina. En la literatura no hay demasiadas referencias a este respecto. Se ha descrito la existencia de una interacción entre la transducina y la fosfatidilserina, que provoca una mayor unión del complejo heterotrimérico a membranas lipídicas (Hessel et al, 2003). En el presente trabajo, no sólo investigamos esta y otras interacciones del heterotrímico, sino también las bases moleculares de dicha interacción.

La transducina está formada por una subunidad  $\alpha$  miristoilada (sin palmitoilar) y una subunidad  $\gamma$  farnesilada en su extremo C-terminal metilado. De igual manera, en este trabajo mostramos que el heterotrímico  $G\alpha_i1\beta1\gamma2$  no palmitoilado  $G\alpha^{Pal^-} + G\beta\gamma^{WT}$  mostró una mayor unión a vesículas de PC con un 40% de PS, que a vesículas de PC, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Hessel et al. Más aún, la mutagénesis dirigida en el extremo C-terminal de la proteína  $G\gamma2$ , que se ha realizado en este estudio, ha contribuido al esclarecimiento del interrogante sobre qué aminoácidos básicos están implicados en la interacción directa del heterotrímico no palmitoilado con la fosfatidilserina. La sustitución de los aminoácidos carboxi-terminales de la proteína  $G\gamma2$ , *Arg-62*, *Lys-64* y *Lys-65* por glicina, anuló la preferencia del heterotrímico  $G\alpha^{Pal^-} + G\beta\gamma^{WT}$  por vesículas de PS. Sin embargo, tales mutaciones no hicieron que el heterotrímico perdiera su capacidad para interaccionar preferencialmente con dominios constituidos por lípidos con propensión no lamelar. Estos resultados confirman nuestra hipótesis acerca del papel director del dímero  $G\beta\gamma$  en la migración de todo el complejo heterotrimérico a través de las membranas biológicas (Vögler et al, 2004; figuras 4-5 y 4-6).



**Figura 4-5. Papel director del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  en la interacción de complejos  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  con membranas lipídicas.** La presencia del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  con el lípido isoprenoide geranylgeraniol unido al extremo C-terminal de la subunidad  $G\gamma_2$ , invirtió la tendencia de la proteína  $G\alpha_i$  monomérica a interactuar preferencialmente con membranas modelo constituidas por PC (\*,  $p < 0,05$ ).

La palmitoilación del heterotrímero, en cambio, indujo un cambio estructural en la proteína G que provocó un comportamiento opuesto de todo el complejo en su interacción con membranas ricas en PS, respecto al observado para el caso del heterotrímero no palmitoilado. En este caso, tanto el heterotrímero palmitoilado constituido por una subunidad  $\gamma$  sin mutar, como aquél formado por la subunidad  $\gamma$  mutada en los tres aminoácidos básicos C-terminales, mostraron el mismo perfil de unión a vesículas ricas en PS. Esto indica que en este nuevo estado conformacional debido a la palmitoilación, los tres aminoácidos básicos mencionados no participan en la interacción con la PS. Se desconoce qué aminoácidos estarían implicados en la repulsión que los dos heterotrímeros palmitoilados experimentaron en presencia de vesículas de PS, aunque las claves de este comportamiento podrían hallarse nuevamente en el dímero  $G\beta\gamma$  (figuras 4-6 y 4-7).



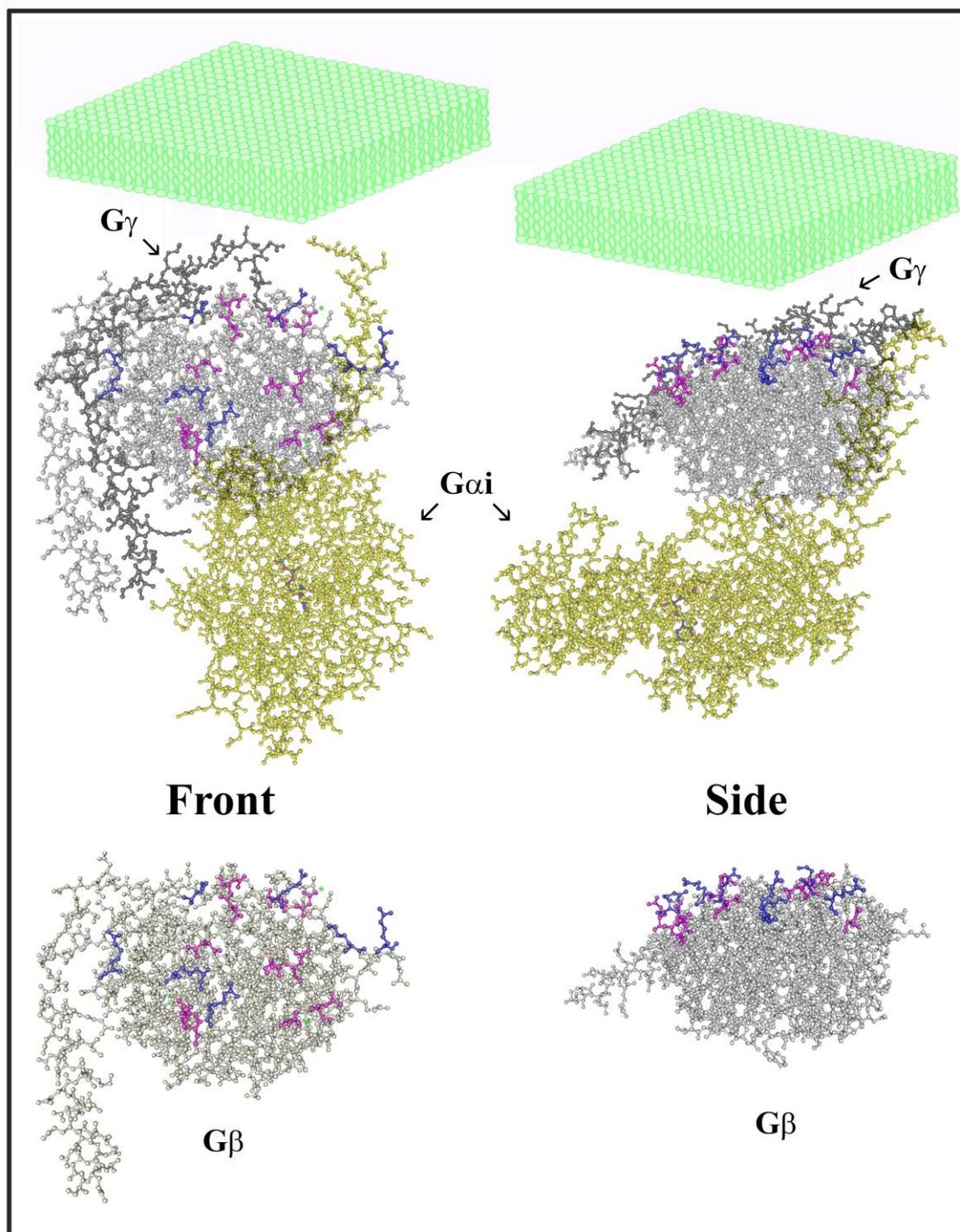
**Figura 4-6. Modelo de interacción del heterotrímero  $G\alpha_i1\beta_1\gamma_2$  con membranas lipídicas.** La palmitoilación de la proteína  $G\alpha_i$  dentro del complejo heterotrimérico, posibilitaría el acercamiento de los aminoácidos con carga negativa de  $G\beta_1$  a la cara interna de la membrana plasmática, lo cual a su vez, condicionaría el destino del complejo de señalización dentro de dicha membrana. Por el contrario, la depalmitoilación de  $G\alpha_i$  propiciaría el alejamiento de los aminoácidos cargados negativamente de  $G\beta_1$  de la membrana, y el acercamiento a la misma de los aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$ .

Tal y como han descrito otros autores (Wall et al, 1995; Neer & Smith, 1996), la proteína  $G\beta$  forma parte de la familia de proteínas con repeticiones del motivo *WD40*, presentando una gran estructura helicoidal que se obtiene por la repetición de siete motivos *WD40*, caracterizados éstos por la conservación de los aminoácidos triptófano y aspartato. En el lado más ancho de esa hélice con forma de barril, se hallarían hasta siete aminoácidos aspartato, uno por cada hoja  $\beta$  constituyente de la hélice. Una posible explicación para definir el comportamiento de los heterotrímeros palmitoilados en presencia de PS, podría hallarse en la reorientación que experimentan éstos y otros aminoácidos con carga negativa de  $G\beta_1$  con respecto a la membrana lipídica, como consecuencia de la incorporación del ácido palmítico a la subunidad  $\alpha$  que está formando parte del heterotrímero (figura 4-6). Así, la palmitoilación de  $G\alpha_i1$  en el

heterotrímico podría provocar un desenmascaramiento de esos aspartatos y glutamatos de la proteína  $G\beta$  (figuras 4-6 y 4-7), que quedarían más expuestos hacia la superficie de la membrana lipídica y, por tanto, hacia lípidos del tipo de PS (figura 4-6). Esto daría lugar a una repulsión electrostática que desplazaría al complejo  $G\alpha\beta\gamma$  palmitoilado fuera de dominios ricos en PS. De esta manera, el dímero  $G\beta\gamma$  estaría condicionando, también en este caso, el destino de todo un complejo heterotrimérico en su interacción con membranas lipídicas.

Esta posible implicación de  $G\beta$  en las interacciones lípido-proteína arroja nuevas pistas acerca del papel que una proteína de las características de  $G\beta$  juega en el proceso de transducción de señales. El descubrimiento de su estructura (Wall et al, 1995) no pasó inadvertido, dada la descorcentante presencia de una proteína perteneciente a la extensa familia de proteínas con repeticiones *WD40* (Neer & Smith, 1996), en el complicado escenario de la señalización celular.

Al igual que ocurrió con los heterotrímicos no palmitoilados, los dos tipos de complejos heterotriméricos palmitoilados estudiados mostraron una unión significativamente mayor a vesículas constituídas por PE que a vesículas de PC. Así, la unión del dímero  $G\beta\gamma$  a una proteína  $G\alpha$  con doble acilación en su extremo amino-terminal, cambió drásticamente la tendencia de  $G\alpha$  para interactuar con estructuras de tipo lamelar, conduciéndola preferentemente hacia ordenamientos lipídicos con baja presión lateral superficial, ricos en lípidos pro-no lamelares (figura 4-5). De este modo, dependiendo del entorno lipídico en el que se encuentre el trímero  $G\alpha\beta\gamma$ , la incorporación del ácido palmítico a  $G\alpha$  puede dificultar más que facilitar la integración estable de todo el complejo heterotrimérico en ese entorno. Así, en regiones con una disposición muy ordenada de los lípidos (dominios  $L_o$ ) habría menos aperturas en la superficie polar de la bicapa por donde pudieran penetrar los tres lípidos unidos a  $G\alpha\beta\gamma$ . Por el contrario, en regiones con alta propensión  $H_{II}$ , habría aperturas en esa superficie que facilitarían la incorporación de un complejo miristoilado, palmitoilado y geranilado, a este tipo de dominios (figuras 4-2 y 4-6). Esto explicaría el importante efecto conjunto de los ácidos palmítico y mirístico y del geranilgeraniol en la unión de complejos  $G\alpha\beta\gamma$  a membranas modelo constituídas por PC y PE, significativamente mayor que a membranas formadas sólo por PC.



**Figura 4-7. Distribución de aminoácidos cargados en el lado más ancho de la gran hélice  $\beta$  de la proteína  $G\beta_1$ .** Los aminoácidos con carga negativa aparecen resaltados en rojo, mientras que los aminoácidos con carga positiva se hallan coloreados de azul. Existe una predominancia de aminoácidos con carga negativa en la superficie estudiada, que además se hallan menos dispersos que los aminoácidos básicos localizados en la misma parte de la proteína. Se cree que ésta es la región de  $G\beta_1$  situada más próxima a la superficie de la membrana plasmática.

En general, el comportamiento de los dos tipos de heterotrímeros palmitoilados construídos,  $G\alpha^{Pal^+} + G\beta\gamma^{WT}$  y  $G\alpha^{Pal^+} + G\beta\gamma^{RKK}$ , en su interacción con las distintas membranas modelo estudiadas, fue muy similar, lo que evidenciaría la

existencia de un cambio conformacional en el heterotrímero que se halla interaccionando con la membrana lipídica, debido a la incorporación del ácido palmítico. A raíz de los resultados obtenidos, ese cambio estructural implica una pérdida de relevancia de los tres aminoácidos básicos del extremo C-terminal de  $G\gamma_2$  en las interacciones proteína G-lípido.

Si exceptuamos al complejo  $G\alpha^{Pal^-} + G\beta\gamma^{RKK}$ , la interacción de los distintos complejos heterotriméricos miristoilados con membranas modelo de tipo “raft” no difirió en general de la observada con membranas de PC (figura 3-2-12). No obstante, como se ha visto en el capítulo 3, la palmitoilación del complejo heterotrimérico supuso una reducción de su afinidad por regiones con un alto ordenamiento lipídico, respecto al heterotrímero miristoilado pero no palmitoilado (figura 3-2-11). El ácido palmítico en una proteína  $G\alpha_1$ , doblemente acilada y en un estado inactivo como parte del complejo  $G\alpha\beta\gamma$ , facilitaría el alejamiento de dominios lipídicos más ordenados y ricos en PS, donde se hallaría el monómero en estado activo, actuando sobre la proteína efectora.

Donde más claramente se observó un efecto en la interacción de los heterotrímeros con membranas lipídicas conteniendo dominios  $L_o$ , fue en el caso de los heterotrímeros constituidos por una proteína  $G\alpha_1^{Myr^-}$ . El heterotrímero  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{WT}$  mostró una clara tendencia a interaccionar con membranas de PC, más que con membranas de tipo PC:PE:Cho:SM. El comportamiento del heterotrímero  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{RKK}$  fue, sin embargo, el contrario, uniéndose en una proporción significativamente mayor a membranas de tipo PC:PE:Cho:SM que a vesículas constituídas únicamente por PC (figura 3-2-12). Así pues, la miristoilación de  $G\alpha$  en el complejo heterotrimérico  $G\alpha\beta\gamma$  condiciona fuertemente la interacción de dicho complejo con dominios de estructura  $L_o$ . En ausencia del ácido mirístico, los tres aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$  adquieren especial relevancia en la interacción con ese tipo de dominios lipídicos.

Importantes estudios acerca de las interacciones de  $G\alpha\beta\gamma$  con diferentes tipos de lípidos han puesto de manifiesto la escasa tendencia del complejo heterotrimérico a interaccionar con dominios ordenados de tipo “raft”, en gran medida condicionado por el tipo de modificaciones lipídicas que porta (Escribá et al, 1995, Escribá et al, 1997; Moffett et al, 2000; Vögler et al, 2004). La importancia de las modificaciones lipídicas en la localización de proteínas de membrana en el plano lateral de la misma ha sido abordada en diversos y originales trabajos (Escribá et al, 1995, Escribá et al, 1997; Melkonian et al, 1999; Moffett et al, 2000; Zacharias et al, 2002; Vögler et al, 2004; Abankwa & Vogel, 2007).

#### **4.4. Modelo general de interacciones entre proteínas G y membranas lipídicas.**

De acuerdo con los resultados obtenidos, se podría postular un modelo de interacción de proteínas G con membranas en el que el heterotrímero  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ , constituido por el lípido isoprenoide geranylgeraniol unido a  $G\gamma_2$ , y por los ácidos mirístico y palmítico unidos a  $G\alpha_1$ , se encontraría con su receptor en una región de la membrana rica en PE y pobre en lípidos aniónicos (figura 4-2). Estos dominios de membrana presentarían una alta propensión a adoptar una conformación de tipo no lamelar, asociada a una menor presión lateral de superficie (es decir, un menor empaquetamiento en la zona interfacial de la membrana). Los aminoácidos aspartato y glutamato, localizados en la cara ancha de la gran hélice  $\beta$  de la proteína  $G\beta_1$ , estarían condicionando el movimiento del complejo heterotrimérico palmitoilado por la membrana.

Con el acoplamiento de proteína G y receptor, se produce la activación del complejo de proteínas G, disociándose la proteína  $G\alpha_1$  doblemente acilada, del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  isoprenilado. La proteína  $G\alpha_1$ , unida a GTP como consecuencia de la activación, estará entonces más expuesta a la pérdida del ácido palmítico unido a su extremo N-terminal (Degtyarev et al, 1994). Con la depalmitoilación de  $G\alpha_1$ , aumentará la tendencia de esta proteína a dirigirse hacia dominios de membrana de tipo “raft” ricos en lípidos aniónicos. La existencia de este tipo de dominios es contemplada en algunos trabajos (Hope & Pike, 1996; Pike & Casey, 1996; Pike & Miller, 1998; Pike, 2003). La migración de una proteína  $G\alpha_1$  miristoilada pero no palmitoilada, hacia regiones de membrana con mayor densidad de carga negativa, estaría favorecida por la existencia de un parche de aminoácidos básicos de la hélice  $\alpha$  N-terminal de la proteína. Todas las proteínas  $G\alpha$  tienen en su hélice  $\alpha$  N-terminal un grupo de aminoácidos básicos que se disponen en su mayoría orientados hacia el mismo lado de la hélice (figura 1-2-8; Kosloff et al, 2002). Estos aminoácidos parecen jugar un papel clave en la interacción de  $G\alpha$  con membranas biológicas (Crouthamel et al, 2008); e, incluso, se cree que son determinantes clave de su localización dentro de la membrana plasmática, en busca de sus respectivas proteínas efectoras (Vögler et al, 2004, Pedone & Hepler, 2007; Crouthamel et al, 2010).

De acuerdo con este modelo general, la proteína  $G\alpha_1$  miristoilada actuaría sobre el enzima adenilil ciclasa en dominios de membrana de tipo “raft” ricos en lípidos

aniónicos. Todas las proteínas  $G\alpha$  tienen actividad GTPasa, siendo inactivadas cuando tiene lugar la transformación de GTP en GDP. La incorporación de ácido palmítico a una proteína  $G\alpha_i$  inactiva, con GDP unido, provocaría un cambio conformacional en la región N-terminal de la proteína, que supondría un desplazamiento de los aminoácidos básicos orientados hacia la cara interna de la membrana plasmática. El desenmascaramiento de aminoácidos con carga negativa y de aminoácidos apolares como consecuencia de la rotación de la hélice  $\alpha$  (figura 1-2-8), provocaría el alejamiento de la proteína  $G\alpha_i$  de los dominios “raft” anteriormente mencionados, hacia otro tipo de dominios “raft” con menor densidad de carga negativa (figura 4-1), donde podría interaccionar con el dímero  $G\beta\gamma$ .

El heterodímero  $G\beta_1\gamma_2$  liberado se movería, por su parte, hacia dominios ricos en PE y lípidos aniónicos, adoptando en la región C-terminal de  $G\gamma_2$  una conformación de tipo helicoidal, con los aminoácidos básicos *Arg-62*, *Lys-64* y *Lys-65* próximos al resto geranilgeraniol (figura 4-2), jugando así un papel estructural clave en la gran preferencia del dímero por ese tipo de dominios lipídicos. Las interacciones de tipo electrostático entre heterodímero y lípidos serían promovidas por los tres aminoácidos básicos carboxi-terminales de  $G\gamma_2$ . En esos dominios, el dímero interaccionaría con otras proteínas efectoras, o con GRK2. El heterodímero, en contacto con la GRK2, acercaría la proteína quinasa hacia el receptor. Es posible que en esta transición, de nuevo los aminoácidos aniónicos de la proteína  $G\beta$  jueguen un papel director si, finalmente, el complejo  $G\beta_1\gamma_2$ -GRK2 adopta una conformación similar a la del heterotrímero  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  palmitoilado. Finalmente, la interacción GRK2-receptor conduce a la desensibilización del receptor (Reiter & Lefkowitz, 2006).

La proteína  $G\alpha_i$  con la doble acilación en tándem en la región N-terminal quedaría incluida, por tanto, en dominios de tipo “raft” con bajo contenido en lípidos aniónicos (figura 4-1). Este tipo de dominios de membrana podrían constituir una región candidata a convertirse en el punto donde se concentraría el grueso de la maquinaria de transducción de señal en fase de inactivación. Así, un complejo receptor- $G\beta_1\gamma_2$ -GRK podría llegar a confluir con la proteína  $G\alpha_i$  palmitoilada inactiva en ese tipo de microdominio de membrana. En esta plataforma, se podría producir el encuentro y la reasociación de  $G\alpha_i$  y  $G\beta_1\gamma_2$ , en una región de la membrana que podría ser susceptible de internalizarse en la célula, pasando a formar parte del sistema endosomal. Así, el complejo heterotrimérico  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  entraría en una ruta de reciclaje que, en último término, le devolvería a la membrana plasmática, previo paso por el aparato de Golgi.

La colocalización descrita de los componentes de señalización  $G\alpha$ ,  $G\beta\gamma$ , receptor e incluso adenilil ciclasa (Huang et al, 1997), podría explicarse a la luz del modelo considerado.

El aparato de Golgi constituye una plataforma de lanzamiento de lípidos, carbohidratos y proteínas hacia la membrana plasmática (Munro, 2005); y como tal, representa un punto de control que regula dicho acceso. Los estudios lipídicos aportan información muy valiosa acerca del mecanismo molecular implicado en esa regulación (Klemm et al, 2009). La preferencia de complejos  $G\alpha\beta\gamma$  no palmitoilados por dominios ricos en PE y PS, y el efecto de la palmitoilación de dichos complejos, desplazándolos hacia dominios ricos en PE pero con bajo contenido en PS, podrían arrojar luz acerca de las características esenciales de ese mecanismo de control de la red del Golgi. Más aún, contribuiría a explicar en gran detalle el significado que tiene la palmitoilación proteica en el aparato de Golgi y las implicaciones de tal fenómeno (Morales et al, 1998; Fishburn et al, 1999; Michaelson et al, 2002; Marrari et al, 2007).

## Capítulo 5

### CONCLUSIONES

Las conclusiones principales de esta tesis son:

- 1) Las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$  de las proteínas G heterotriméricas portan grupos lipídicos que son cruciales para su anclaje a membranas lipídicas y para su desplazamiento entre distintos dominios lípido-proteicos dentro de las membranas biológicas.
- 2) La estructura de los lípidos de las proteínas G, y los dominios de aminoácidos con carga situados próximos a ellos, son determinantes en la preferencia de las distintas proteínas G por unos u otros microdominios de membrana.
- 3) Los ácidos grasos mirístico y palmítico, con una morfología lineal y unidos en tándem a la proteína  $G\alpha_1$ , determinan la preferencia de esta proteína por microdominios ordenados de tipo “lipid raft”.
- 4) El ácido palmítico constituye un potente modulador biológico que regula el tránsito de la proteína  $G\alpha_1$  entre distintos dominios de tipo “raft”, a través de la unión reversible del lípido a dicha proteína.
- 5) La palmitoilación de  $G\alpha_1$  favorece la movilización de la proteína a dominios de tipo “raft” con baja densidad de cargas negativas. Por su parte, la depalmitoilación de  $G\alpha_1$  implica una rotación de su hélice N-terminal, que provoca el acercamiento de aminoácidos básicos de esa parte de la proteína a la superficie de la membrana lipídica. Esta reorganización estructural determina el tránsito de la proteína hacia aquellos microdominios de tipo “raft” con mayor densidad de cargas negativas dentro de la membrana.
- 6) La presencia del lípido isoprenoide geranylgeraniol, unido a la cisteína carboxi-terminal de la proteína  $G\gamma_2$ , es crucial para el anclaje del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  a las membranas lipídicas. Este lípido, junto con los aminoácidos básicos de la proteína  $G\gamma_2$ , *Arg-62*, *Lys-64* y *Lys-65*, situados en su vecindad, constituyen un motivo estructural que condiciona decisivamente el destino del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  dentro de las membranas lipídicas.

- 7) *Arg-62*, *Lys-64* y *Lys-65* posibilitan la unión del heterodímero  $G\beta_1\gamma_2$  a las bicapas lipídicas a través de interacciones de tipo electrostático. La interacción de estos aminoácidos con fosfolípidos cargados negativamente, tales como la fosfatidilserina, contribuye a una mayor concentración de este tipo de lípidos en microdominios ricos en PE.
- 8) Los aminoácidos *Arg-62* y *Lys-65*, junto con el lípido geranilgeraniol, determinan la preferencia de  $G\beta_1\gamma_2$  por microdominios de membrana ricos en PE, con alta propensión a adoptar una estructura de tipo no lamelar. Además, restringen notablemente el acceso del dímero  $G\beta_1\gamma_2$  a microdominios de tipo “raft”.
- 9) La miristoilación de la proteína  $G\alpha_i$  en su extremo N-terminal, junto con la presencia del lípido geranilgeraniol en el extremo C-terminal de  $G\gamma_2$ , son críticos para la asociación preferencial de todo el complejo  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  a microdominios lipídicos con elevada propensión a adoptar una estructura no lamelar.
- 10) El ácido palmítico constituye un potente modulador de señal también en el caso del complejo heterotrimérico  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$ , a través de su unión reversible a la subunidad  $G\alpha_i$  de dicho complejo. Su incorporación a la proteína  $G\alpha_i$  implica un cambio de potencial electrostático en la superficie del complejo multiproteico en contacto con la membrana lipídica. El resultado es un desplazamiento de todo el complejo heterotrimérico desde microdominios lipídicos de alta propensión no lamelar y ricos en lípidos aniónicos, hacia microdominios de similares características estructurales pero empobrecidos en lípidos con carga neta negativa.
- 11) Los tres aminoácidos básicos de la región C-terminal de  $G\gamma_2$  son los determinantes moleculares clave de las interacciones de tipo electrostático que se establecen entre un heterotrímero  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  no palmitoilado y los microdominios lipídicos ricos en lípidos de tipo aniónico.
- 12) Las tres modificaciones lipídicas del complejo  $G\alpha_i\beta_1\gamma_2$  constituyen un motivo estructural fundamental que determina la preferencia del heterotrímero por microdominios lipídicos con menor grado de ordenamiento y alta propensión a adoptar una estructura de tipo no lamelar, lejos de microdominios de tipo “raft” donde se localizaría predominantemente el monómero  $G\alpha_i$  activo.

## Capítulo 6

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 6.1. MATERIALES.

El kit del sistema de expresión del baculovirus (*Bac-to-Bac Baculovirus Expression System Kit*), que incluye el vector de clonación *pFastBac<sup>TM</sup> 1*, se compró a *Invitrogen* (Nueva York, EEUU). También se compraron a *Invitrogen* el reactivo de transfección *Cellfectin<sup>®</sup>*, la resina Ni-NTA para cromatografía de afinidad y el medio *Grace's* para el cultivo de células de la línea Sf9. El kit de ligación de ADN (*Rapid DNA Ligation Kit*), así como las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*, se obtuvieron de *Fermentas* (Madrid, España). La enzima ADN polimerasa de *Thermophilus aquaticus* se compró a *BIOTOOLS* (Madrid, España). La enzima fosfatasa alcalina de gamba se adquirió de la compañía *USB Corporation* (Staufen, Alemania). El medio de cultivo *Miller's LB Broth* es de *Laboratorios Conda* (Barcelona, España). Los antibióticos penicilina y estreptomicina empleados en cultivo celular son de la marca *PAA* (Pasching, Austria), mientras que el suero bovino fetal lo suministró la compañía *Sigma-Aldrich* (Missouri, EEUU). El kit de extracción *Plasmid purification Midi kit* se compró a *Qiagen* (Maryland, EEUU). Tanto las columnas de concentración de proteína *Amicon*, como el kit de extracción de ADN (*DNA Gel Extraction Kit*), se compraron a *Millipore* (Massachusetts, EEUU). El detergente CHAPS se consiguió de *AppliChem* (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos anti-G $\alpha$ <sub>1</sub> (R-4), anti-G $\beta$ <sub>1</sub> (C-16), anti-G $\gamma$ <sub>2</sub> (A-16) y anti-*His-probe* (H-3) se compraron a *Santa Cruz Biotechnology* (California, EEUU), y el anticuerpo policlonal anti-G $\alpha$ <sub>1/2</sub>, a *Calbiochem* (Darmstadt, Alemania). Los anticuerpos *anti-mouse* y *anti-rabbit*, conjugados con la enzima peroxidasa de rábano, y los reactivos *ECL* y *ECL plus* se obtuvieron de *Amersham* (Buckinghamshire, Inglaterra). Los anticuerpos *anti-mouse* y *anti-rabbit*, conjugados con el fluoróforo de infrarrojo *IRDye<sup>TM</sup> 800CW*, así como la estreptavidina conjugada con el fluoróforo *IRDye<sup>TM</sup> 680LT*, son de la compañía *Li-cor Biosciences* (Nebraska, EEUU). El complejo biotina-HPDP (*N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide*) lo suministró *Thermo Fisher Scientific* (Massachusetts, EEUU).

Los lípidos palmitoil-CoA, L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (huevo de ave), L- $\alpha$ -fosfatidiletanolamina (hígado de rata), esfingomiélinea (huevo de ave), L- $\alpha$ -fosfatidilserina (cerebro porcino) y colesterol (lana ovina), se compraron a *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, EEUU). El ácido 2-fluoropalmítico se consiguió de la compañía *Biomol Internacional* (Lausana, Suiza).

Los siguientes productos se compraron a *Sigma-Aldrich* (Missouri, EEUU): albúmina de suero bovino, ampicilina, Bluo-Gal, cloruro de aluminio, C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>, DTT, EDTA, fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF), fluoruro de sodio, GDP, GDP $\beta$ S, gentamicina, HEPES, hidroxilamina, ácido 2-hidroximirístico, imidazol, inhibidor de tripsina, IPTG, kanamicina, leupeptina, N $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK), N-p-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), polyoxyethylene 10 lauryl ether (C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>), S-metil metanotiosulfonato, tetraciclina, Tris-HCl.

Los siguientes reactivos se obtuvieron de *Scharlau Chemie S.A.* (Barcelona, España): acetato potásico, cloroformo, cloruro de magnesio, cloruro potásico, cloruro sódico, disodio hidrógeno fosfato, glicina, metanol, potasio dihidrógeno fosfato, SDS.

El ácido perclórico (60%), el  $\beta$ -mercaptoetanol y la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) los suministró la compañía *Merck* (Darmstadt, Alemania).

## 6.2. MÉTODOS.

### 6.2.1. Experimentos de mutagénesis dirigida en la secuencia de la subunidad $\alpha_1$ de la proteína G y clonación de las secuencias mutadas resultantes.

En los experimentos de mutagénesis dirigida en la proteína  $G\alpha$  se empleó como secuencia molde el ADNc codificante de la secuencia de aminoácidos de la proteína  $G\alpha_1$  de rata, contenido en el vector pQE-60 (3,4 kb). El laboratorio del Dr. Alfred G. Gilman (Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center) proporcionó amablemente esta construcción. El ADNc se introdujo después en el vector de expresión eucariota pFastBac<sup>TM</sup> 1 (*Invitrogen*).

La proteína recombinante resultante de este ADNc porta un epítipo interno de 6 histidinas en la posición 121 (secuencia de aminoácidos **GGHHHHHHGGG**MTA, resaltada en negrita en la secuencia completa de la proteína mostrada más abajo). La inserción de seis histidinas en esa posición se debió a la escasa relevancia estructural y funcional de esa región de la proteína, donde la subunidad  $\alpha$  de la proteína GPA1 de levaduras tiene un largo inserto comparado con las subunidades  $\alpha$  de mamíferos. Esta secuencia ya ha sido descrita con anterioridad en otros trabajos (Herrmann et al, 2004).

H<sub>2</sub>N-GCTLSAEDKAAVERSKMIDRNLRDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIEAGYS  
EEECKQYKAVVYSNTIQSIIAIRAMGRLKIDFGDAARADDARQLFVLGAAEEGFMTAG**GGHHH**  
**HHHGGG**MTAELAGVIKRLWKDSGVQACFNRSREYQLNDSAAYYLNDLDRIAQPNIPTQQDV  
LRTRVKTTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRSEKRWIHC FEGVTAIIFCVALS DYDLVLAEDDEE  
MNRMHESMKLFDSICNNKWFTDTSIILFLNKKDLFEEKIKKSPLTICYPEYAGSNTYEEAAAYIQC  
QFEDLNKRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDVAVTDVIIKNNLKDCGLF-COOH

Las mutaciones en el extremo amino-terminal de la proteína  $G\alpha_1$  se obtuvieron mediante una PCR, utilizando oligonucleótidos sentido que llevaron incorporada la secuencia diana para la enzima de restricción *EcoRI* en su extremo 5'. Por otra parte, el oligonucleótido antisentido (no portador de mutaciones), llevó incorporada la secuencia

de reconocimiento de la enzima *NotI* en sus extremos 5'. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 6-1.

**Tabla 6-1. Oligonucleótidos empleados en la clonación de las distintas proteínas G $\alpha_1$ .**

Proteínas	oligonucleótidos sentido
<i>wild-type</i> G $\alpha_1$	$\begin{array}{c} \text{EcoRI} \quad \text{CDS} \\ \hline 5\text{'-ATCGAATTCATGGGCTGCACGCTGAGCGCC-3'} \end{array}$
<i>Myr<sup>-</sup></i> G $\alpha_1$	$5\text{'-ATCGAATTCATGGCCTGCACGCTGAGCGCC-3'}$
<i>Pal<sup>-</sup></i> G $\alpha_1$	$5\text{'-ATCGAATTCATGGGCTCCACGCTGAGCGCC-3'}$
	oligonucleótido antisentido
	$\begin{array}{c} \text{NotI} \\ \hline 5\text{'-CTGGCGGCCGCTTAAAAGAGACCACAATCT-3'} \end{array}$

La PCR se llevó a cabo con un termociclador *Mastercycler gradient thermocycler* de la compañía *Eppendorf* (Hamburgo, Alemania). La reacción de amplificación constó de 35 ciclos, en cada uno de los cuales hubo una desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, seguida de un anillamiento a 65 °C durante 45 segundos más y, finalmente, una elongación de las hebras de ADN a 72 °C durante 3 minutos. Tras los 35 ciclos de amplificación, tuvo lugar un último paso de elongación a 72 °C durante 10 minutos. En la PCR, se emplearon la enzima ADN polimerasa de *Thermophilus aquaticus* (Taq polimerasa, 0,025 U/ $\mu$ l), los oligonucleótidos sentido (0,25  $\mu$ M) y antisentido (0,25  $\mu$ M), dNTPs (125  $\mu$ M) y el ADN molde (500 ng), en el tampón de reacción para PCR (75 mM Tris HCl pH 9,0, 50 mM KCl, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 80  $\mu$ l.

Los productos de PCR se purificaron mediante electroforesis en gel de agarosa y posterior extracción del ADN a partir del gel, utilizando el kit de extracción *DNA Gel Extraction Kit* de *Millipore*. A continuación, los fragmentos de ADN purificados se precipitaron con acetato potásico 3 M (pH 5,5) a un 10% (v/v) del volumen final total de la solución, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 2 volúmenes de etanol absoluto frío por cada volumen de solución acuosa. Después de 1 hora a -80 °C, las muestras de ADN se centrifugaron a 15.000 x g, a 4 °C, 10 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con etanol al 70% frío. Se realizó una última centrifugación a 15.000 x g, a 4°C, durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet final de ADN se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua desionizada.

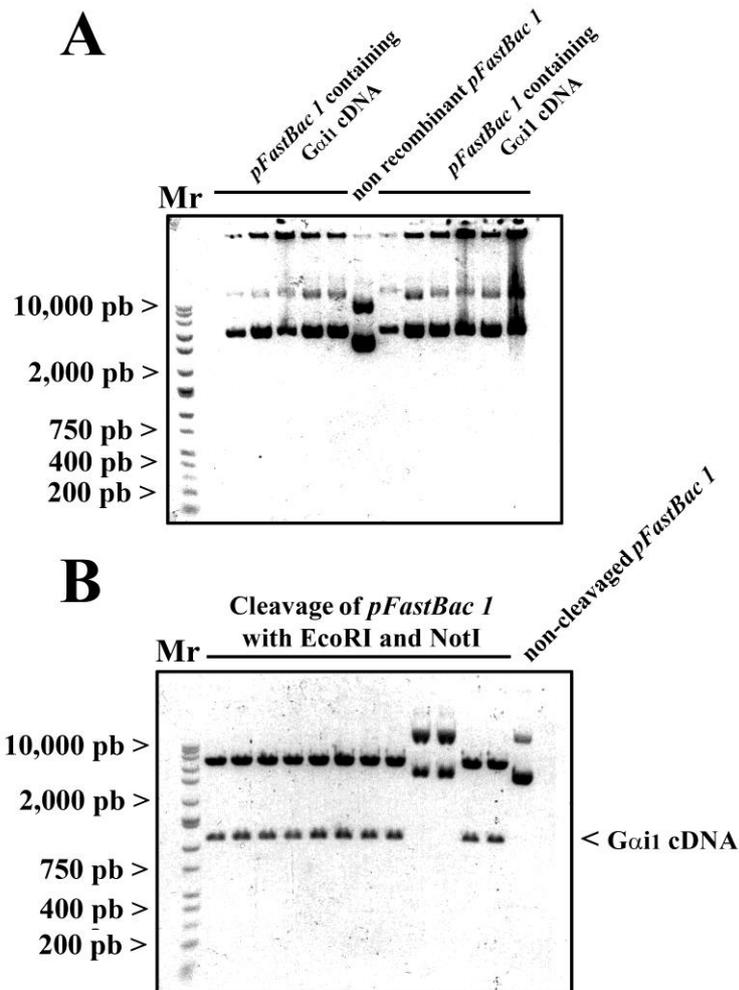
El ADN anterior obtenido por PCR se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* (0,5 UI/ $\mu$ l) en tampón O (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl y 0,1 mg/ml BSA) a 37 °C, durante 1 hora y 45 minutos. Las reacciones se detuvieron mediante inactivación enzimática a 65 °C, durante 30 minutos.

Por su parte, 5  $\mu$ g del vector pFastBac<sup>TM</sup> 1 se digirieron con las enzimas de restricción anteriormente indicadas (0,3 UI/ $\mu$ l), bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura. Tras la digestión enzimática, se defosforiló el extremo 5' del vector con la enzima fosfatasa alcalina (0,2 UI/ $\mu$ l) en tampón SAP (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,1 mg/ml BSA), a 37 °C durante 1 hora y 30 minutos. La inactivación enzimática se llevó a cabo a 65 °C durante 30 minutos. A continuación, se purificó el plásmido digerido y defosforilado mediante electroforesis en gel de agarosa, y posterior extracción del vector a partir del gel mediante el kit de extracción *DNA Gel Extraction Kit*.

El plásmido pFastBac<sup>TM</sup> 1 digerido, defosforilado y purificado, se limpió de sales y proteínas mediante extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) primero, y con cloroformo después. A continuación se precipitó y se lavó el ADN como se ha descrito anteriormente.

La reacción de ligación entre el ADNc correspondiente a la proteína  $G\alpha_{i1}$  y el vector pFastBac<sup>TM</sup> 1 linearizado, tuvo lugar por los sitios de restricción *EcoRI* y *NotI*, empleando el kit de ligación *Rapid DNA Ligation Kit*. Para ello, se mezclaron el vector y el ADNc en una proporción 1:3 (mol:mol). La reacción fue catalizada por la enzima ADN ligasa T4 (0,3 UI/ $\mu$ l) en el tampón de ligación (40 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT y 0,5 mM ATP), a 25 °C durante 1 hora.

Tras la ligación, se transformaron bacterias de la cepa *XLI-Blue* de *Escherichia coli* con parte de la mezcla de reacción. Después de 24 horas de cultivo en placas con medio LB y ampicilina (100  $\mu$ g/ml), se seleccionaron algunas de las colonias formadas y se procedió a un primer cribado para determinar cuáles de ellas fueron portadoras del plásmido recombinante mediante el análisis de su movilidad electroforética. El plásmido recombinante mostró una movilidad electroforética notablemente distinta a la del plásmido no recombinante (figura 6-1 A).

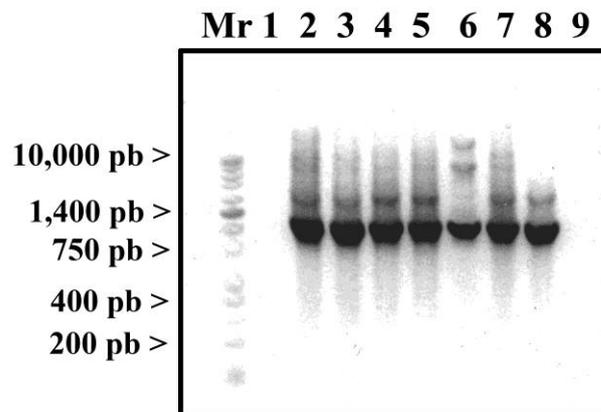


**Figura 6.1. Experimentos de electroforesis para identificación de vectores *pFastBac 1* recombinantes.** A, Movilidad electroforética del vector *pFastBac 1* no recombinante y del vector recombinante. Este ensayo permitió una rápida identificación de vectores recombinantes portadores del ADNc de la proteína *Gai1*. B, Doble digestión enzimática de vectores *pFastBac 1* con las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI*. En el carril de la derecha se cargó un vector *pFastBac 1* no digerido, como control del experimento. En la calle de la izquierda se cargaron los marcadores de peso molecular, y en el resto de los carriles, posibles vectores *pFastBac 1* recombinantes. En todos los casos, menos en dos, hubo digestión completa del vector y obtención de un producto de digestión correspondiente al ADNc de la proteína *Gai1*.

Un segundo cribado consistió en la digestión enzimática del vector con las enzimas *EcoRI* y *NotI*, para determinar la presencia o ausencia del inserto de 1,2 kb (figura 6-1 B). Finalmente, el último cribado consistió en la comprobación mediante PCR de la inserción, utilizando oligonucleótidos que flanquean la zona de inserción del ADNc (figura 6-2).

El plásmido recombinante resultante se extrajo de bacterias *XLI-Blue* y se purificó por el método de lisis alcalina (SDS 1%, NaOH 0,2 N) y posterior precipitación con isopropanol (Sambrook & Russell, 2001). Las secuencias de todas las construcciones se

validaron mediante secuenciación del ADN, realizada por la empresa *Sistemas Genómicos S.L.* (Valencia, España).



**Figura 6.2. Detección por PCR del fragmento de ADN de interés.** En la figura, se puede observar el producto de PCR de aprox. 1250 kb correspondiente al ADNc de la proteína *Gai<sub>1</sub>* (calles 2-8). El control positivo correspondió al producto de amplificación del ADNc de la proteína *Gai<sub>1</sub> Myr<sup>-</sup>*, cargado en el carril 8. En el carril 9 se cargó el blanco de la reacción de PCR.

## 6.2.2. Experimentos de mutagénesis dirigida en la secuencia de la subunidad $\gamma_2$ de la proteína G y clonación de las secuencias mutadas.

En los experimentos de mutagénesis dirigida en la proteína  $G\gamma$  se empleó como secuencia molde el ADNc codificante de la secuencia de aminoácidos de la proteína  $G\gamma_2$  humana, contenido en el vector pIND (5 kb). El Dr. Scott Gibson (*Southwestern Medical School, University of Texas*) proporcionó amablemente el plásmido recombinante. Como en el caso de  $G\alpha_1$ , este ADNc se introdujo después en el vector de expresión eucariota pFastBac<sup>TM</sup> 1 (*Invitrogen*).

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante  $G\gamma_2$  humana, que ha sido objeto de estudio:

H<sub>2</sub>NMASNNTASIAQARKLVEQLKMEANIDRIKVSAAAADLMAYCEAHAKEDPLLTPVPAENPFR  
EKKFFCAIL-COOH

Como en el caso de la mutagénesis dirigida al extremo amino-terminal de la proteína  $G\alpha_1$ , las mutaciones introducidas en el extremo carboxilo de la proteína  $G\gamma_2$  se obtuvieron mediante PCR, utilizando oligonucleótidos que contenían las secuencias diana de las enzimas de restricción *EcoRI* y *NotI* en sus respectivos extremos 5'. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en la obtención del ADNc, correspondientes a las distintas proteínas  $G\gamma_2$  recombinantes mutadas, se muestran en la tabla 6-2.

El resto de pasos que condujeron a la clonación de la secuencia de ADN de la proteína  $G\gamma_2$  humana en el plásmido recombinante pFastBac<sup>TM</sup> 1, fueron los mismos que permitieron la clonación del ADN codificante correspondiente a la proteína  $G\alpha_1$  (para más detalles, véase el apartado 6.2.1. en este mismo capítulo).

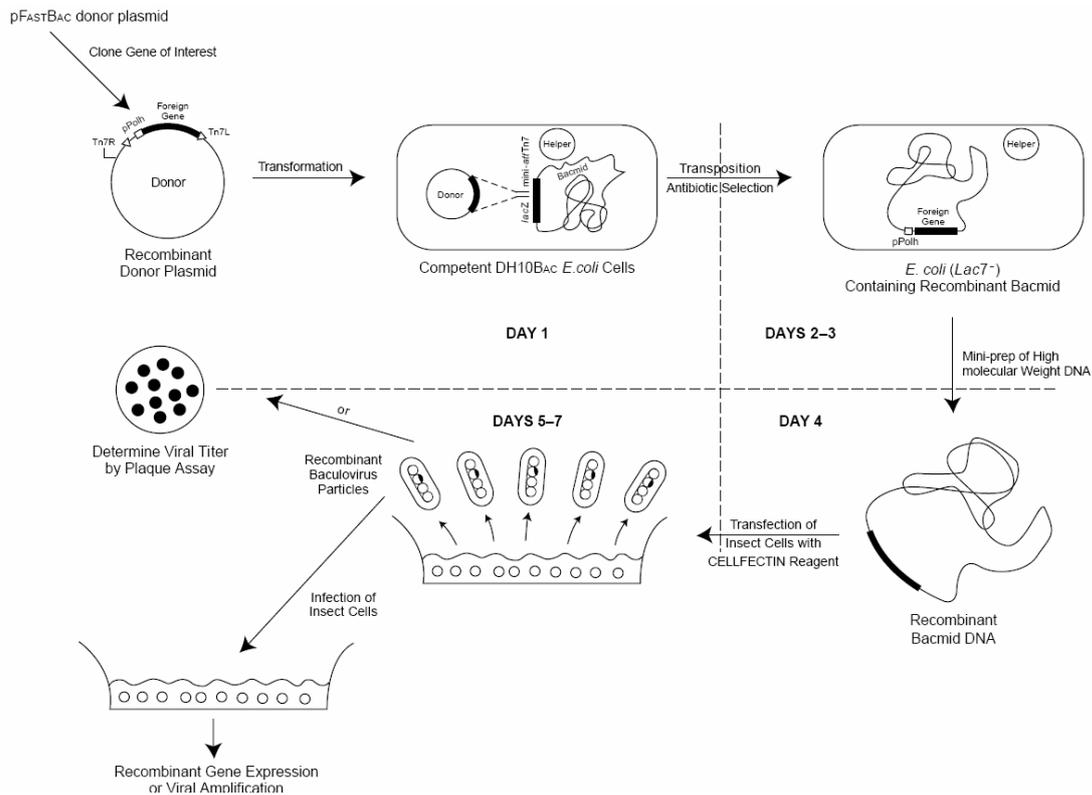
**Tabla 6-2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en el proceso de mutagénesis de  $G\gamma_2$ .**

Proteínas	oligonucleótido sentido
	$\xrightarrow{\text{EcoRI}}$ $\xrightarrow{\text{CDS}}$ 5'-ATCGAATTCATGGCCAGCAACAACACCGCCAGCATAGCACAAGCCAG-3'
oligonucleótidos antisentido	
<i>wild type</i> $G\gamma_2$	$\xrightarrow{\text{NotI}}$ 5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCACAGAA-3'
$GER^-$ $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCAGAGAA-3'
<i>R62G</i> $G\gamma_2$	$\xrightarrow{\text{NotI}}$ 5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCACAGAAAACTTCTTCTCCCAAA-3'
<i>K64G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCACAGAAAACTTCCCTCCCTAAA-3'
<i>K65G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCACAGAAAAACCCCTTCTCCCTAAA-3'
<i>R62G K64G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCACAGAAAACTTCCCTCCCTAAA-3'
<i>R62G K65G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCACAGAAAAACCCCTTCTCCCTAAA-3'
<i>K64G K65G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCACAGAAAAACCCCTCCCTAAA-3'
<i>R62G K64G K65G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCACAGAAAAACCCCTCCCTAAA-3'
$GER^-$ <i>R62G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCAGAGAAAACTTCTTCTCCCTAAA-3'
$GER^-$ <i>K64G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCAGAGAAAACTTCCCTCCCTAAA-3'
$GER^-$ <i>K65G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCAGAGAAAAACCCCTTCTCCCTAAA-3'
$GER^-$ <i>R62G K64G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCAGAGAAAACTTCCCTCCCTAAA-3'
$GER^-$ <i>R62G K65G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCAGAGAAAAACCCCTTCTCCCTAAA-3'
$GER^-$ <i>K64G K65G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCAGAGAAAAACCCCTCCCTAAA-3'
$GER^-$ <i>R62G K64G K65G</i> $G\gamma_2$	5'-CTCGCGGCCGCTTAAAGGATAGCAGAGAAAAACCCCTCCCTAAA-3'

La reacción de amplificación constó de 35 ciclos. Cada ciclo constó de una desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, seguida de un anillamiento a 65 °C durante 45 segundos y, finalmente, una elongación de las hebras de ADN a 72 °C durante otros 45 segundos. Tras los 35 ciclos de amplificación, tuvo lugar un último paso de elongación a 72 °C durante 10 minutos. Los nucleótidos marcados en rojo corresponden a las distintas mutaciones introducidas en la secuencia normal de bases de la proteína G $\gamma_2$  (ver tabla en la página anterior).

### 6.2.3. Expresión de proteínas G recombinantes en células Sf9.

La expresión de proteínas recombinantes en células Sf9 se realizó mediante el sistema de expresión del baculovirus *Bac-to-Bac Baculovirus Expression System Kit* (figura 6.3).



**Figura 6.3. Generación de baculovirus recombinantes y expresión génica con el sistema de expresión del baculovirus.**

Las bacterias de la cepa *DH10Bac*<sup>TM</sup> de *E. coli* contienen el *bácmido*, que es un vector de expresión constituido principalmente por el genoma del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (*AcNPV*). Este genoma consta de una gran molécula de ADN circular (130 kb), de doble cadena. El método que se describe en estas páginas permite generar rápidamente baculovirus recombinantes por medio de la transposición

específica de sitio en *E. coli* (Luckow et al, 1993). Para ello se empleó el báculo anteriormente mencionado, que es capaz de replicarse como un gran plásmido en *E. coli* y que además, conserva la capacidad infecciosa cuando se introduce en células de insecto.

El báculo presenta un replicón mini-F que permite la replicación autónoma en bajo número de copias, un marcador de resistencia a kanamicina y un segmento de ADN que codifica el péptido LacZ $\alpha$ . Dentro de este gen se encuentra un sitio con afinidad por el transposón bacteriano Tn7: este sitio se denomina mini-attTn7.

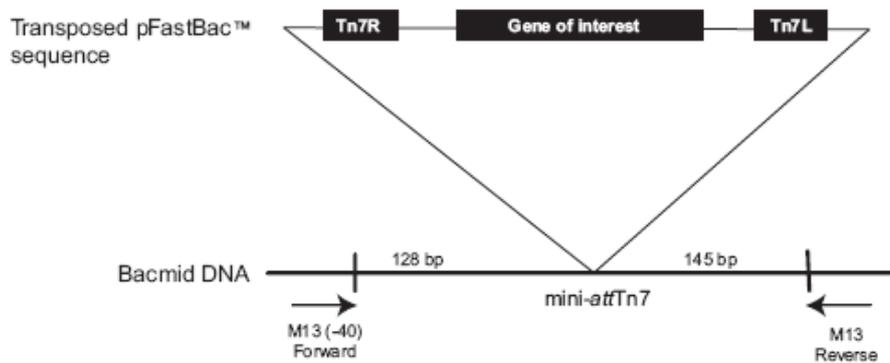
El báculo se propaga en bacterias *DH10Bac* al estilo de un gran plásmido, que complementa una delección lacZ presente en el cromosoma de *E. coli*. La porción amino-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa, codificada por la región LacZ $\alpha$  del báculo, es capaz de compensar el mal funcionamiento de la  $\beta$ -galactosidasa (*lacZ $\Delta$ M15*), codificada por el cromosoma bacteriano. Se trata de un fenómeno de complementación intra-alélica ( $\alpha$ ), el cual tiene lugar en presencia del inductor isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG), que permite activar la síntesis del péptido LacZ $\alpha$  del báculo. Mediante esta complementación, estas bacterias son capaces de formar colonias azules (Lac<sup>+</sup>) en un medio de cultivo sólido que contenga IPTG y un sustrato cromogénico, como el bluo-gal o el X-gal (Luckow et al, 1993)

Los báculos recombinantes (“*composite bacmids*”) se generaron mediante la transposición de un elemento mini-Tn7 desde el plásmido donante pFastBac<sup>TM</sup> 1 al sitio diana en el báculo. El plásmido pFastBac<sup>TM</sup> 1 contiene el promotor del gen de la poliedrina, que regulará la expresión del gen clonado, flanqueado a uno y a otro lado por los extremos del transposón Tn7. El elemento transponible del plásmido donante, mini-Tn7, se transpone al vector diana (báculo) en *E. coli*, siendo las funciones de transposición Tn7 proporcionadas por el plásmido *helper* (13,2 kb). Este plásmido codifica el enzima que cataliza el proceso, la transposasa.

Así pues, se llevó a cabo la transformación de bacterias competentes de la cepa *DH10Bac*, someténdolas a un choque térmico de 42°C, en presencia del plásmido recombinante pFastBac<sup>TM</sup> 1. Tras la transformación, se seleccionaron las colonias en un medio selectivo, compuesto por medio *Miller's LB Broth* (10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l NaCl, pH 7 a 25 °C), kanamicina (50  $\mu$ g/ml), tetraciclina (10  $\mu$ g/ml), gentamicina (7  $\mu$ g/ml), bluo-gal (100  $\mu$ g/ml) e IPTG (40  $\mu$ g/ml). A las 48 horas de iniciado el cultivo, ya se puede determinar si se ha producido la transposición del

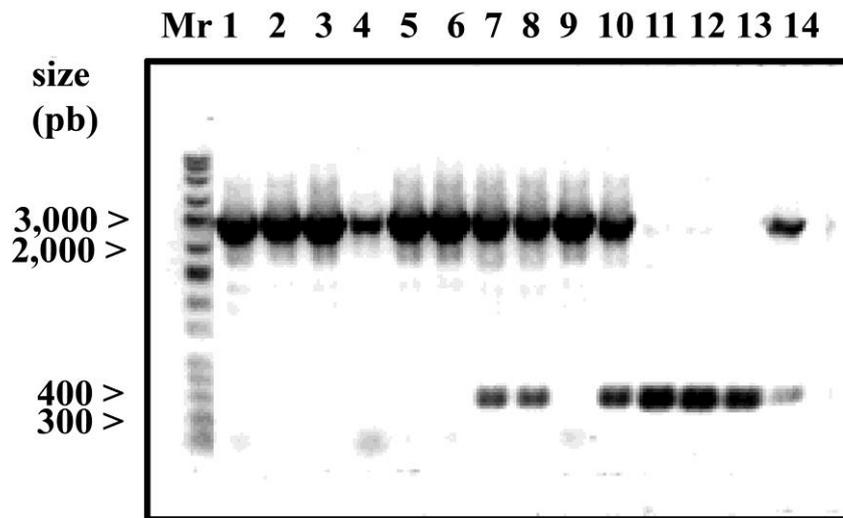
elemento Tn7 del plásmido donante pFastBac<sup>TM</sup> 1 al b́acmido. En aquellas bacterias donde ha ocurrido la inserci3n del elemento transponible Tn7 en el b́acmido, se genera un p3ptido LacZ $\alpha$  alterado y no funcional, de modo que ya no hay complementaci3n intra-al3lica. En consecuencia, las bacterias no son capaces de degradar el sustrato cromog3nico blu-gal y, por tanto, no se genera el producto que confiere el color azul a la colonia. Tras 72 horas de cultivo, se seleccionaron las colonias de color blanco, que en principio deberían portar el b́acmido recombinante, con la secuencia para la sntesis de la prote3na recombinante.

El b́acmido fue extraído de bacterias de la cepa *DH10Bac* por el mismo m3todo aplicado a la extracci3n del vector pFastBac<sup>TM</sup> 1 de bacterias *XLI-Blue* (Sambrook & Russell, 2001). Una vez obtenido el b́acmido, se comprob3 la presencia del gen de inter3s en este vector mediante PCR. Para ello, se emplearon los cebadores M13 Forward (-40) (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') y M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), que hibridan con lugares que flanquean el sitio mini-attTn7, situado dentro de la regi3n de complementaci3n LacZ $\alpha$  del b́acmido (figura 6-4).



**Figura 6-4. Esquema que representa el análisis de ADN del b́acmido por PCR, para determinar si el gen de inter3s est3 o no presente en dicho vector de expresi3n.**

Si ha habido transposici3n del elemento mini-Tn7 al b́acmido, entonces se espera que el tamaño del producto de PCR tenga una longitud que resulta de ańadir 2300 pb al tamaño del fragmento de ADN clonado en el vector pFastBac<sup>TM</sup> 1. Si no ha habido transposici3n, el tamaño del producto de PCR ser3 de unas 300 pb (figura 6.5).



**Figura 6.5. Análisis de ADN del b́acmido por PCR.** Mediante PCR se pudo determinar qúe colonias de las seleccionadas contuvieron el b́acmido recombinante con la secuencia correspondiente a la mutaci3n *K64G*. Se comprob3 que las colonias correspondientes a los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 9 portaron el b́acmido de inter3s. En los carriles 7, 8 y 10, tambi3n est3 la banda de 2600 pb, pero aparece adem3s la banda de 300 pb. Esto indica la presencia tanto de b́acmidos recombinantes como de b́acmidos no recombinantes en las colonias correspondientes a estas tres 3ltimas muestras. Las muestras de ADN correspondientes a los carriles 11, 12 y 13 se obtuvieron a partir de colonias azules que crecieron en un medio selectivo con bluo-gal. En estas bacterias no deber3 haberse producido la transposici3n del elemento Tn7, lo cual se demuestra por la presencia de una 3nica banda de unos 300 pb en el gel de agarosa.

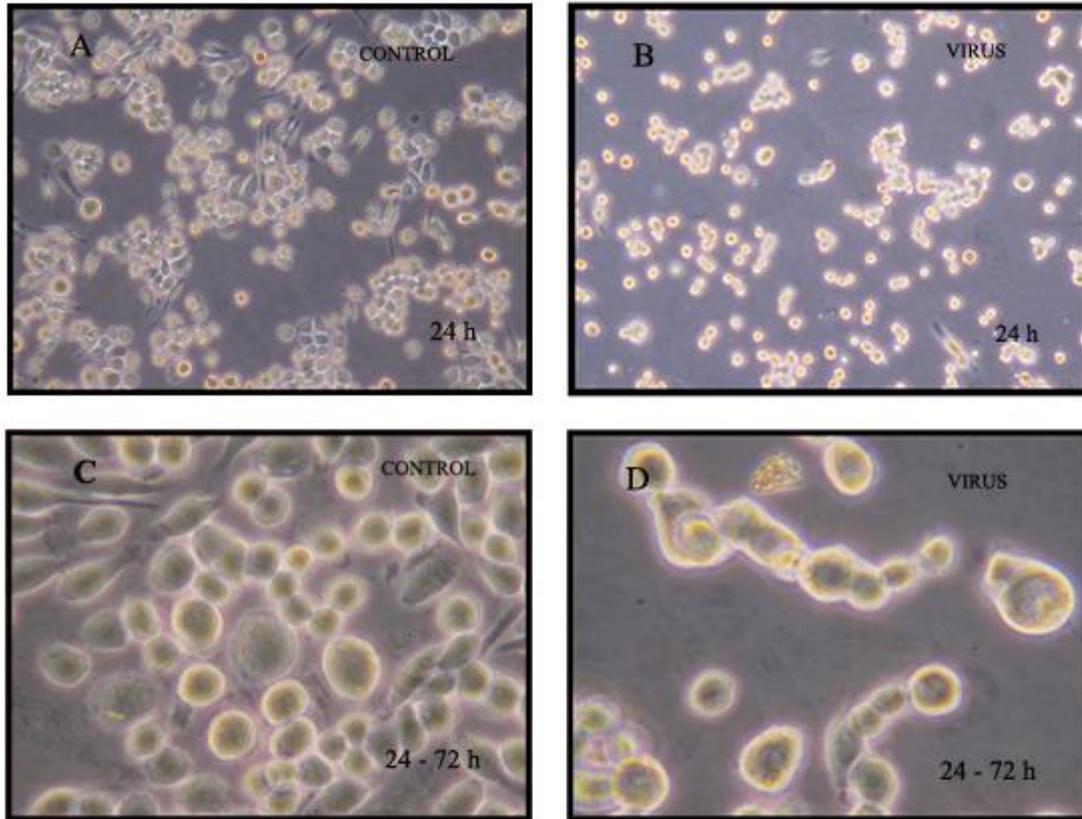
La expresi3n del transgen, introducido en el b́acmido, se llev3 a cabo en c3lulas de insecto de la l3nea Sf9, derivada de tejido de ovario del lepid3ptero *Spodoptera frugiperda*. En estas c3lulas, tienen lugar la mayor3a de las modificaciones postraduccionales que normalmente ocurren en c3lulas de mam3feros y, adem3s, se producen altos niveles de prote3na recombinante.

### *Transfección en células Sf9*

La transfección en células Sf9 se realizó mediante lipofección con *Cellfectin*<sup>®</sup>. Este reactivo es una suspensión de liposomas, compuestos por el lípido catiónico N, N<sup>I</sup>, N<sup>II</sup>, N<sup>III</sup> – Tetramethyl – N, N<sup>I</sup>, N<sup>II</sup>, N<sup>III</sup> – tetrapalmitoileispermina (TM-TPS) y por dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE), en una proporción 1:1,5 (mol/mol). Para llevar a cabo la transfección, se mezclaron bécrido y liposomas, en presencia de medio *Grace's* no suplementado con suero bovino fetal (SBF). El medio de cultivo contenía L-glutamina y bicarbonato sódico (0,35 g/l). Se añadió esta mezcla a células Sf9 cultivadas en placas de 6 pocillos (*Nunc*<sup>TM</sup>). El volumen añadido fue de 1 ml por pocillo. Además de este tratamiento, se emplearon como controles del experimento, medio *Grace's* sin SBF y con el bécrido sólo, y por otro lado, el mismo medio conteniendo únicamente liposomas. Finalmente, otro control consistió en medio *Grace's* sin SBF. Se incubó la placa a 27 °C durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio líquido de cada uno de los pocillos, y se añadieron 2 ml de medio *Grace's* completo (medio con 10% SBF y 1% antibiótico y antimicótico). Después, se mantuvieron las células en presencia de ese medio, durante 72 horas aproximadamente. En ese tiempo, se llevó a cabo un seguimiento y registro de los cambios que se fueron produciendo en los distintos pocillos.

Se tomaron fotografías de los controles y de las células transfectadas, a las 24, 48 y 72 horas de iniciada la transfección (figura 6-6). Las fotografías fueron tomadas con una cámara fotográfica digital *Coolpix 4500* (*Nikon*), acoplada a un microscopio óptico invertido *Leica DMIL*.

Tras tres días de crecimiento en presencia de medio *Grace's* completo, se recolectaron las células Sf9 de los pocillos y se homogeneizaron las muestras resultantes, para poder analizar, mediante “western-blot”, la expresión de proteína G recombinante en células transfectadas. Así, 72 horas después del inicio de la transfección, se despegaron las células de la superficie de la placa con un raspador (*scraper*), y la suspensión celular se centrifugó a 600 x g durante 5 minutos. Se obtuvo, de este modo, medio *Grace's* con virus, constituyendo la colección viral P1.



**Figura 6-6.** A, fotografía de células Sf9 no infectadas por el baculovirus (células control), tomada a las 24 horas de iniciarse el experimento (100X). B, fotografía de células Sf9, tomada 24 horas después de inocular el virus en el frasco de cultivo (100X). C, fotografía de células de insecto no infectadas (células control), tomada entre 24 y 72 horas después de iniciado el experimento (400X). D, fotografía de células Sf9 infectadas tomada en una fase tardía de la infección (24 – 72 horas) (400X).

Tras un lavado de las células con el tampón salino PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 12 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,38 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), el botón celular resultante se resuspendió en 300 µl de tampón de extracción de proteína (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, pH 7,4), con SDS al 1% y los inhibidores de proteasas iodoacetamida (5 mM) y PMSF (1 mM). El homogeneizado celular se hizo pasar por una fina aguja de 25G x 5/8". A continuación, se añadió tampón de carga para electroforesis de proteínas. Se hirvieron las muestras durante 3 minutos y finalmente, se llevó a cabo un "western-blot" para determinar si hubo o no sobreexpresión de la proteína de interés. Se compararon las muestras control, obtenidas de células Sf9 no transfectadas, con las muestras obtenidas de células que expresaron las distintas proteínas G recombinantes (figura 2-2-3, "capítulo 2").

La suspensión viral P1 se empleó para infectar células Sf9 cultivadas en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (*Nunc<sup>TM</sup>*). Se añadieron a los frascos 3 ml de dicha suspensión y se dejaron las células en presencia de ese volumen de medio infectivo, durante aproximadamente 5 horas. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 3 ml de medio *Grace's* completo. 72 horas después del inicio de la infección, se recuperó el medio con baculovirus (colección viral P2). Además, se obtuvo un extracto celular por el método anteriormente descrito, para su posterior análisis.

Así, mediante sucesivos ciclos de infección, se generó una colección completa de stocks virales, con toda la información genética necesaria para la expresión, en células eucariotas, de las diferentes proteínas G recombinantes que han sido objeto de estudio en esta tesis (tablas 6-1 y 6-2).

Haciendo uso de esta colección, se llevaron a cabo infecciones con un sólo tipo de baculovirus recombinante. También se realizaron diversas coinfecciones, consistentes en la combinación de dos tipos de baculovirus recombinantes diferentes, para la obtención de dímeros G $\beta\gamma$ , o de tres tipos diferentes, para dar lugar a complejos G $\alpha\beta\gamma$ . El objetivo fue estudiar la interacción de cada una de las subunidades de la proteína Gi heterotrimérica, y de diferentes complejos diméricos y heterotriméricos obtenidos a partir de ellas, con membranas biológicas correspondientes a células eucariotas de la línea Sf9.

#### **6.2.4. Ensayos de unión de las proteínas G a membranas biológicas.**

Las células Sf9 se infectaron o coinfectaron con baculovirus recombinantes portadores de las secuencias de ADN correspondientes a las proteínas G $\gamma_2$  “wild type”, G $\gamma_2$  *K64G* (mutación Lys-64→Gly-64), G $\gamma_2$  *GER<sup>-</sup> K64G* (mutaciones Lys-64→Gly-64 y Cys-68→Ser-68), G $\gamma_2$  *GER<sup>-</sup> K65G* (mutaciones Lys-65→Gly-65 y Cys-68→Ser-68), G $\beta_1$  “wild type”, G $\alpha_1$  “wild type”, G $\alpha_1$  *Pal<sup>-</sup>* (mutación Cys-3→Ser-3) y G $\alpha_1$  *Myr<sup>-</sup>* (mutación Gly-2→Ala-2). Las células se recolectaron 48 horas después de haber inoculado los virus en las botellas de cultivo. Todos los pasos de homogeneización y fraccionamiento tuvieron lugar a 25 °C.

La suspensión celular se centrifugó a 600 x g durante 5 minutos. El concentrado celular resultante se resuspendió en tampón K (20 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM GDP, 0,5 μg/ml leupeptina, pH 7,4), y se volvió a centrifugar a 600 x g, 5 minutos. El concentrado celular se resuspendió finalmente en 1 ml de tampón K y se llevó a cabo una sonicación con un sonicador *Branson*, de la compañía *G.HEINEMANN* (Schwäbisch Gmünd, Alemania), a una amplitud del 10 %, con 6 pulsos de 10 segundos y 10 segundos de pausa entre pulso y pulso. En el caso del estudio de proteínas G $\alpha_1$  monoméricas, el tampón K no fue preparado con GDP, sino con GTP (20 μM).

El homogeneizado celular resultante se centrifugó 10 minutos a 1000 x g, en una minicentrífuga *Eppendorf*, para descartar células intactas y núcleos. El sobrenadante de esta primera centrifugación se ultracentrifugó a 100.000 x g, durante 1 hora (rotor tipo 25, ultracentrífuga *Beckman* modelo *LE-80*). El sobrenadante obtenido tras esta última centrifugación constituyó la fracción citosólica. El precipitado se resuspendió en un volumen de tampón de lisis idéntico al de sobrenadante, constituyendo la fracción particulada. Ambas fracciones fueron analizadas por “western-blot”, al objeto de determinar la proporción relativa de proteínas G presentes en cada una de ellas.

En aquellos casos en los que se determinó la cantidad total de proteína G presente en ambas fracciones, la cuantificación se llevó a cabo empleando patrones de proteína G de concentración conocida. Así, se construyó una recta de cuantificación basada en las densidades ópticas de las señales de inmunorreactividad, correspondientes a cada concentración conocida de proteína. La determinación final de la cantidad de proteína G presente en cada fracción se hizo mediante interpolación dentro de la recta, partiendo de la densidad óptica integrada correspondiente a las señales de las muestras problema.

## 6.2.5. Purificación de las proteínas G.

### 6.2.5.1. Purificación de las subunidades $G\alpha_{i1}$ .

La purificación de las diferentes proteínas  $G\alpha_{i1}$  recombinantes, mutadas y sin mutar, se llevó a cabo utilizando un protocolo de Kozasa y Gilman modificado (Kozasa & Gilman, 1995). Para la producción de proteína recombinante, se cultivaron en suspensión las células Sf9 en medio *Grace's*, suplementado con SBF al 10% (v/v), 100 U/ml penicilina y 100  $\mu$ g/ml estreptomicina.

#### *Purificación de la proteína mutante $G\alpha_{i1} Myr^-$ .*

Se infectaron las células Sf9, sembradas en frascos de cultivo de 175 cm<sup>2</sup> (*Nunc<sup>TM</sup>*), con baculovirus recombinantes portadores de la secuencia de ADN codificante de la proteína  $G\alpha_{i1} Myr^-$ . Cuarenta y ocho horas después de la inoculación viral, las células se recolectaron y se centrifugaron a 600 x g, durante 5 minutos. A continuación, se lavaron las células, resuspendiendo el pellet celular en tampón L frío (20 mM HEPES pH 8,0, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl) y volviendo a centrifugar a 600 x g, durante 5 minutos. Tras esta segunda centrifugación, las células se resuspendieron en 5 ml de tampón L, conteniendo 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 10  $\mu$ M GDP, 1mM PMSF, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptina, 20  $\mu$ g/ml TLCK, 20  $\mu$ g/ml TPCK y 30  $\mu$ g/ml inhibidor de tripsina. Los restantes procedimientos tuvieron lugar a 4 °C, a menos que se indique lo contrario.

La homogeneización celular se llevó a cabo empleando una bomba de nitrógeno, bajo las condiciones descritas por Kozasa y Gilman (Kozasa & Gilman, 1995). El lisado celular obtenido se centrifugó a 3.000 x g, durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se centrifugó a 100.000 x g, durante 1 hora (rotor *50 Ti*, ultracentrífuga *Beckman* modelo *LE-80*). Tras la ultracentrifugación, la proteína recombinante  $G\alpha_{i1} Myr^-$  se purificó a partir de la fracción de sobrenadante, mediante cromatografía de afinidad en una columna Ni-NTA de 6 ml (*Invitrogen*).

La matriz cromatográfica de níquel, con la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$  unida a ella, se lavó con 30 ml de tampón W1 (20 mM HEPES pH 8,0, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 400 mM NaCl, 0,05% (p/v)  $C_{12}E_{10}$ , 10  $\mu$ M GDP, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptin, 15 mM imidazol). Estos lavados se hicieron aplicando un gradiente térmico creciente y discontinuo (10 ml a 4 °C; 10 ml a 17 °C y 10 ml a 25 °C), favoreciendo de este modo la elución de proteínas adsorbidas inespecíficamente a la resina (Lowe, 1979). A continuación, la columna se lavó con 20 ml de tampón de lavado W2 (20 mM HEPES pH 8,0, 0,5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM NaCl, 0,05% (p/v)  $C_{12}E_{10}$ , 10  $\mu$ M GDP, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptin, 15 mM imidazol), a 30 °C. Tras estos lavados, se activó la columna cromatográfica con 10 ml de tampón B (20 mM HEPES pH 8,0, 50 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 mM NaCl, 0,05% (p/v)  $C_{12}E_{10}$ , 30  $\mu$ M  $AlF_3$ , 10 mM NaF, 10  $\mu$ M GDP, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptin, 15 mM imidazol), también a 30 °C. La elución final de la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$  se consiguió con tampón E (20 mM HEPES pH 8,0, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 0,05% (p/v)  $C_{12}E_{10}$ , 10  $\mu$ M GDP, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptin), y con concentraciones crecientes de imidazol. El gradiente discontinuo de imidazol que se pasó por la columna fue el siguiente: 80 mM (3 ml), 120 mM (3 ml), 240 mM (5 ml) y, finalmente, 300 mM (30 ml).

Las distintas fracciones colectadas de la columna Ni-NTA se analizaron por el método de tinción de Coomassie y, también, mediante la técnica de “western-blot” (para una descripción detallada de estos dos métodos, consultar los subapartados 6.2.10 y 6.2.11). A partir de las fracciones obtenidas, se mezclaron aquellos eluidos más enriquecidos en la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$ . La proteína se concentró en una columna *Amicon Ultra-15*, con capacidad para retener proteínas de peso molecular superior a 30 kDa. El concentrado proteico se dializó frente a tampón D (20 mM HEPES pH 8,0, 3 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5  $\mu$ M GDP, 50 ng/ml leupeptin). Finalmente, la proteína recombinante purificada se alicuotó y se congeló a -80 °C hasta su uso.

## *Purificación de las proteínas $G\alpha_1$ “wild type” (WT) y $G\alpha_1 Pal^-$ .*

Para la purificación de las proteínas  $G\alpha_1$  “wild type” y  $G\alpha_1 Pal^-$ , se recurrió a la fracción de membranas totales de las células Sf9, obtenida mediante ultracentrifugación a 100.000 x g, siguiendo el protocolo anterior. Este enfoque es clave para la obtención de proteínas  $G\alpha_1$  recombinantes, con las modificaciones lipídicas necesarias para llevar a cabo sus funciones, tal y como remarcan Kozasa y Gilman (Kozasa & Gilman, 1995), y como corroboramos en este trabajo.

Las células Sf9 se infectaron al mismo tiempo con tres tipos diferentes de baculovirus recombinantes, portadores de la información para la síntesis de las proteínas  $G\alpha_1$  ( $G\alpha_1 WT$  o  $G\alpha_1 Pal^-$ , según convenga),  $G\beta_1$  y  $G\gamma_2$ . En relación con esto, se ha demostrado que la expresión del heterotrímero aumenta la cantidad de subunidad  $\alpha$  activa en las fracciones de membrana (Kozasa & Gilman, 1995).

Tras 48 horas de cultivo, las células se recolectaron y se homogeneizaron del modo en que se indicó en el protocolo anterior de purificación, correspondiente a la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$ . Después de la ultracentrifugación a 100.000 x g, el pellet de membranas resultante se resuspendió en 6 ml de tampón S (50 mM HEPES pH 8,0, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 500 mM NaCl), al que se le añadió CHAPS (16 mM), GDP (10  $\mu$ M) y los mismos inhibidores de proteasa del tampón L. Se tuvo la muestra en suave agitación durante 1 hora a 4 °C y, a continuación, se realizó una nueva ultracentrifugación en frío de 1 hora a 100.000 x g (rotor *50 Ti*). El sobrenadante resultante, que constituyó el extracto de membrana, se sometió a diálisis frente al tampón L, suplementado con 0,5  $\mu$ M de GDP y 50 ng/ml leupeptina.

La muestra dializada se cargó en una columna cromatográfica de tipo Ni-NTA y el proceso de purificación proteica fue el mismo que el descrito para la proteína  $G\alpha_1 Myr^-$ , con ligeras modificaciones. Así, la concentración de GDP en los tampones de lavado y en el tampón B de activación fue de 1 mM. El gradiente de imidazol empleado para la elución de la proteína recombinante  $G\alpha$  fue muy similar: 40 mM (3 ml), 80 mM (3 ml), 120 mM (3 ml), 240 mM (5 ml) y 300 mM (30 ml). Se disminuyó la concentración de DTT en el tampón de diálisis D a 0,4 mM.

### 6.2.5.2. Purificación de los heterodímeros $G\beta_1\gamma_2$ .

La purificación de todos los complejos  $G\beta_1\gamma_2$  recombinantes estudiados se llevó a cabo según el método empleado por Kozasa y Gilman (Kozasa & Gilman, 1995), con algunas modificaciones.

Las células Sf9 se cultivaron en suspensión en medio *Grace's* completo y, posteriormente, se infectaron con baculovirus recombinantes portadores de distintas versiones de la secuencia de ADN codificante, correspondientes a la proteína  $G\gamma_2$ . Tanto la proteína  $G\gamma_2$  “wild type” (WT), como las restantes proteínas  $G\gamma_2$  mutadas en la región carboxi-terminal (tales mutaciones aparecen detalladas en la tabla 6-2), se sobreexpresaron en dichas células, en combinación con las proteínas recombinantes  $G\alpha_{i1}$  WT y  $G\beta_1$  WT. Así, se obtuvieron complejos  $G\alpha\beta\gamma$  claves para la posterior obtención en forma pura de los distintos heterodímeros  $G\beta_1\gamma_2$  objeto de estudio.

Tras 48 horas de cultivo, las células se recolectaron y se homogeneizaron siguiendo el mismo protocolo que se empleó para la purificación de las proteínas  $G\alpha_{i1}$ , excepto que el tampón de lisis fue el tampón S, con GDP (10  $\mu$ M) y con los mismos inhibidores de proteasas que se añadieron al tampón L. El homogeneizado resultante se pasó de nuevo por la bomba de nitrógeno y, a continuación, se centrifugó la muestra a 3000 x g durante 10 minutos. La fracción de sobrenadante se llevó hasta un volumen total de 10 ml, añadiéndole CHAPS a una concentración final de 16 mM (p/v). La muestra se tuvo en suave agitación durante 1 hora, a 4 °C, y después se ultracentrifugó durante 1 hora a 100.000 x g (rotor 50 Ti). El sobrenadante resultante (extracto de membrana) fue dializado en tampón D2 (20 mM NaHepes pH 8,0, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM NaCl) con 0,5  $\mu$ M GDP y 50 ng/ml leupeptina, sin otros inhibidores de proteasas.

La muestra dializada se cargó en una columna Ni-NTA (*Invitrogen*) de 3 ml, previa adición de GDP a una concentración final de 1 mM. Se incubó un volumen de muestra de 2,5 ml con la resina de níquel en suave balanceo, a 4 °C, durante 15 minutos, dejándola 10 minutos más en posición vertical. Tras la primera elución, se añadieron 2,5 ml más de muestra a la columna y se procedió de la misma manera que antes. La columna se lavó con 20 ml de tampón W1\* (20 mM NaHepes pH 8,0, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 400 mM NaCl, 0,05% (p/v)  $C_{12}E_{10}$ , 1 mM GDP, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptina). Durante estos primeros lavados de la columna, se aplicó el mismo

gradiente de temperatura creciente y discontinuo (4, 17 y 25 °C) utilizado en la purificación de proteínas  $G\alpha_1$ . A continuación, se lavó con 5 ml de tampón W2\* (20 mM NaHepes pH 8,0, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 100 mM NaCl, 0,05% (p/v)  $C_{12}E_{10}$ , 1 mM GDP, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptina y 5 mM imidazol) a 25 °C. Se lavó la columna con 20 ml más del mismo tampón, a 30 °C. La columna se activó después con 15 ml de tampón B\* (20 mM NaHepes pH 8,0, 50 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 50 mM NaCl, 0,05% (p/v)  $C_{12}E_{10}$ , 30  $\mu$ M  $AlF_3$ , 10 mM NaF, 10  $\mu$ M GDP, 0,5  $\mu$ g/ml leupeptina), a 30 °C. Las diferentes fracciones recogidas de la columna se analizaron mediante tinción de Coomassie e “immunoblotting” (ver apartados 6.2.10 y 6.2.11 para más detalles). Los distintos dímeros  $G\beta_1\gamma_2$  eluyeron con el tampón B\*. Se mezclaron aquellas fracciones en las que se hallaban más enriquecidos. Esta mezcla de fracciones se diluyó en tampón D2, conteniendo DTT (1 mM) en lugar de  $\beta$ -mercaptoetanol. A continuación, se dializó la muestra frente a este mismo tampón.

La muestra dializada se concentró posteriormente en una columna de concentración *Amicon Ultra-15*, capaz de retener proteínas de peso molecular superior a 30 kDa. Se hicieron alícuotas del concentrado y las muestras se congelaron en  $N_2$  líquido y se almacenaron a -80°C.

### **6.2.6. Obtención de los complejos heterotriméricos $G\alpha\beta\gamma$ mediante cromatografía de afinidad.**

Las diferentes formas recombinantes de  $G\alpha_1$ , purificadas por el método anteriormente descrito, se mezclaron con heterodímeros  $G\beta\gamma$ , también purificados, en una ratio aproximada 1:1,5 (w:w). Así, por cada  $\mu$ g de proteína  $G\alpha$  se añadieron 1,5  $\mu$ g de heterodímero  $G\beta\gamma$ . La muestra se liofilizó mediante un liofilizador *Virtis ADVANTAGE (SP Scientific)*. El residuo de proteína G se resuspendió hasta una concentración de 25-50 ng/ $\mu$ l en agua con 5 mM GDP $\beta$ S. Se incubó la mezcla a 30 °C durante 30 minutos. A continuación, se diluyó en tampón de unión a columna Ni-NTA (20 mM NaHepes pH 8,0, 0,4 mM DTT, 100 mM KCl, 0,05% (p/v)  $C_{12}E_{10}$ , 0,5 mM GDP). La muestra se añadió a un tubo de 1,5 ml conteniendo resina Ni-NTA y se tuvo en suave agitación, toda la noche, a 4 °C. A continuación, se centrifugó la muestra a

800 x g, durante 2 minutos y a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y el pellet, constituido por la matriz Ni-NTA, se resuspendió en 500 µl de tampón de lavado (20 mM NaHepes pH 8,0, 0,4 mM DTT, 100 mM KCl, 0,005% (p/v) C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>, 0,5 mM GDP). En total, se practicaron cuatro lavados de la columna a 4 °C, centrifugando en las mismas condiciones descritas anteriormente. Finalmente, se eluyeron las proteínas unidas a la matriz de afinidad añadiendo 150 µl de tampón de elución (20 mM NaHepes pH 8,0, 0,4 mM DTT, 100 mM KCl, 0,005% (p/v) C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>, 0,5 mM GDP, 300 mM imidazol) a 30 °C. Hubo tres rondas de elución y, por tanto, un volumen total de muestra eluída de 450 µl.

La muestra resultante del experimento de cromatografía de afinidad se diluyó en tampón de filtración (20 mM NaHepes pH 8,0, 1 mM DTT, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 50 µM GDP), y se filtró con una columna de concentración *Amicon*, con capacidad de retención de proteínas de peso molecular superior a 50 kDa. Este proceso se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (*Millipore*), centrifugando la muestra con una fuerza centrífuga relativa máxima de 13.000 x g. El concentrado final se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C.

Fue así como se obtuvieron muestras enriquecidas en los siguientes complejos heterotriméricos:

- i)  $G\alpha^{Pal^+} + G\beta\gamma^{WT}$ , sin mutación alguna en cualquiera de sus subunidades.
- ii)  $G\alpha^{Pal^-} + G\beta\gamma^{WT}$ , con mutación en la cisteína amino-terminal de la subunidad  $G\alpha_{i1}$  (Cys-3→Ser-3).
- iii)  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{WT}$ , con mutación en la glicina amino-terminal de la subunidad  $G\alpha_{i1}$  (Gly-2→Ala-2).
- iv)  $G\alpha^{Pal^+} + G\beta\gamma^{RKK}$ , con mutaciones en los tres aminoácidos básicos de la región carboxi-terminal de la subunidad  $G\gamma_2$  (Arg-62→Gly-62, Lys-64→Gly-64, Lys-65→Gly-65).
- v)  $G\alpha^{Pal^-} + G\beta\gamma^{RKK}$ , con mutaciones en la cisteína amino-terminal de la subunidad  $G\alpha_{i1}$  (Cys-3→Ser-3), y en los tres aminoácidos básicos de la región carboxi-terminal de la subunidad  $G\gamma_2$  (Arg-62→Gly-62, Lys-64→Gly-64, Lys-65→Gly-65).

vi)  $G\alpha^{Myr^-} + G\beta\gamma^{RKK}$ , con mutaciones en la glicina amino-terminal de la subunidad  $G\alpha_{i1}$  (Gly-2→Ala-2), y en los tres aminoácidos básicos de la región carboxi-terminal de la subunidad  $G\gamma_2$  (Arg-62→Gly-62, Lys-64→Gly-64, Lys-65→Gly-65).

## 6.2.7. Caracterización de las proteínas G recombinantes.

### 6.2.7.1. Caracterización lipídica de las proteínas $G\alpha_{i1}$ .

#### *Inhibición de la miristoilación y la palmitoilación de las proteínas $G\alpha_{i1}$ .*

Se infectaron un total aproximado de 3 millones de células Sf9 con baculovirus recombinantes, portadores de la información necesaria para la síntesis de las proteínas  $G\alpha_{i1}$  “wild type” (WT) y  $G\alpha_{i1}^{Pal^-}$ . Transcurridas 16 horas desde la inoculación viral, se añadieron a los frascos de cultivo los inhibidores de miristoilación y palmitoilación, el ácido 2-hidroximirístico (45  $\mu$ M) y el ácido 2-fluoropalmítico (30  $\mu$ M), respectivamente. Se incubaron las células en presencia de estos inhibidores de acilación proteica durante 32 horas.

Para llevar a cabo estos experimentos, se prepararon soluciones de los dos análogos de ácidos grasos a una concentración 200 mM, disolviéndolos en etanol absoluto. Los inhibidores se añadieron al medio de cultivo en las concentraciones arriba indicadas.

Tras un total de 48 horas de cultivo, las células se recolectaron de los frascos de cultivo mediante raspado de la superficie. A continuación las células se centrifugaron a 600 x g, 5 minutos. Después las células se lavaron con tampón de extracción de proteína (10 mM Tris-Cl, 50 mM NaCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 mM EDTA, pH 7,4) y se volvieron a centrifugar. Los concentrados celulares se resuspendieron en 300  $\mu$ l de tampón de extracción, suplementado con 1% SDS e inhibidores de proteasas como en el tampón L. Las muestras se sonicaron utilizando un sonicador *Branson*, aplicando 2 pulsos de 10 segundos al 30% de amplitud, con una pausa de 10 segundos entre pulso y pulso. Todos estos pasos de lavado y homogeneización tuvieron lugar a 4 °C.

Las proteínas presentes en los lisados se separaron mediante electroforesis *SDS-PAGE*, en geles de poliacrilamida al 8,5%, y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, para su posterior detección con anticuerpos. La técnica de “western-blot” se aplicó de acuerdo con el procedimiento que se detalla en el apartado 6.2.10.1. Para la detección de la proteína  $G\alpha_i$ , se emplearon el anticuerpo anti- $G\alpha_i$ , a una dilución 1/400, y el anticuerpo anti-*mouse*, conjugado con el fluoróforo de infrarrojo *IRDye<sup>TM</sup> 800CW*, a una dilución 1/5000.

### *Caracterización lipídica de proteínas $G\alpha_i$ purificadas.*

Una proteína  $G\alpha_i$  *WT* miristoilada y su homóloga no miristoilada, obtenida después del tratamiento con el ácido 2-hidroximirístico, se utilizaron como estándares proteicos para la caracterización lipídica de proteínas  $G\alpha_i$  recombinantes, expresadas en células Sf9 y purificadas por el método descrito en el apartado 6.2.5. Así, proteínas  $G\alpha_i$  purificadas, obtenidas a partir de diferentes fracciones celulares, junto con las proteínas  $G\alpha_i$  control miristoilada y no miristoilada, se separaron mediante electroforesis de tipo *SDS-PAGE*, y posteriormente se analizaron por “western-blot”, bajo idénticas condiciones a las descritas en el subapartado anterior.

### *Palmitoilación no enzimática de la proteína $G\alpha_i$ .*

El protocolo empleado en la palmitoilación química de la proteína  $G\alpha_i$  “wild type” (*WT*) fue una adaptación del procedimiento descrito por Duncan y Gilman (Duncan & Gilman, 1996). Brevemente, una reacción química de palmitoilación de una proteína  $G\alpha_i$  *WT* (0,1-0,3  $\mu$ M), miristoilada y purificada, tuvo lugar en *tampón A* (20 mM HEPES, 2 mM  $MgCl_2$ , 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,2 mM DTT, 0,5  $\mu$ M GDP, pH 7,6), en presencia de palmitoil-CoA (20  $\mu$ M) y CHAPS (7,5 mM). El tiempo de reacción fue de 180 minutos, y la temperatura de 30 °C. Tras este paso de reacción, se dializó la muestra de proteína  $G\alpha_i$  *WT*, miristoilada y palmitoilada, frente a un *tampón D* con 0,2 mM DTT. Finalmente, alícuotas de la muestra dializada se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Los complejos heterotriméricos, constituidos por la proteína  $G\alpha_i$  *WT* miristoilada y obtenidos de la forma descrita en el apartado 6.2.6, se sometieron también a una

reacción de palmitoilación *in vitro*, en las mismas condiciones descritas anteriormente, y en la línea de otros trabajos anteriores (Moffett et al, 2000).

La palmitoilación de la proteína  $G\alpha_{i1}$  *WT* en la cisteína-3 se demostró mediante una adaptación del protocolo de Drisdell y Green (Drisdel & Green, 2004). En primer lugar, las proteínas  $G\alpha_{i1}$  “wild type” y  $G\alpha_{i1}$  *Pal<sup>-</sup>*, purificadas por el método descrito en el apartado 6.2.5.1, se sometieron a una reacción de palmitoilación *in vitro*. Tras esta reacción, cada proteína  $G\alpha_{i1}$  recombinante (600 ng) se trató con S-metil metanotiosulfonato al 0,1%, en un tampón con 250 mM HEPES, 1 mM EDTA y 2,5 mM SDS, durante 20 minutos, a 50 °C. Este paso permitió el bloqueo de grupos tiol libres en la proteína. A continuación, se dializaron las muestras frente a una solución de PBS (1X) y 1 mM EDTA. Tras la diálisis, las proteínas recombinantes se llevaron a una solución de hidroxilamina 1 M, pH 7,4. La hidroxilamina aporta gran poder reductor al medio en el que está la proteína, lo que supone la liberación de aquellos grupos palmitoílo que se hallan unidos a las proteínas a través de enlaces tioéster. Como consecuencia de esto último, quedaron desenmascarados grupos sulfhidrilo en las cisteínas de las proteínas. Después de este tratamiento, se inició un nuevo ciclo de diálisis de las muestras frente a PBS (1X) y 1 mM EDTA.

Las muestras dializadas se incubaron durante 1 hora con 0,2 mM biotina-HPDP, a temperatura ambiente. Este complejo reacciona con los grupos sulfhidrilo de la proteína, quedando la biotina unida a la proteína a través de un puente disulfuro y liberándose en el proceso *pyridine-2-thione*. Se aplicó la técnica de “western-blot” a este estudio, siguiendo el protocolo detallado en el apartado 6.2.10.1, al objeto de detectar proteína  $G\alpha_{i1}$  biotinilada. Para ello, el tampón de carga de electroforesis (10X) añadido a las muestras no contuvo  $\beta$ -mercaptoetanol. Además, se cargaron las muestras en el gel de electroforesis sin hervir previamente. Para la detección de proteína  $G\alpha_{i1}$  total, se emplearon un anticuerpo anti- $G\alpha_{i1}$ , a una dilución 1/600, y un anticuerpo secundario anti-*mouse*, a una dilución 1/5.000. Después de este primer revelado con anticuerpos, se detectó la proteína  $G\alpha_{i1}$  biotinilada por el mismo sistema, tras incubación con estreptavidina, conjugada con el fluoróforo de infrarrojo *IRDye<sup>TM</sup> 680LT*, durante toda la noche, a 4 °C.

### **6.2.7.2. Caracterización lipídica de los heterodímeros G $\beta_1\gamma_2$ .**

La movilidad electroforética de los complejos G $\beta_1\gamma_2$  geranilados difirió notablemente de la movilidad de los complejos purificados no geranilados en un gel de poliacrilamida no desnaturizante. Así, la caracterización del estado de geranilación de estos complejos se llevó a cabo mediante “western-blot” no desnaturizante (véase apartado 6.2.10.2 para una descripción detallada del proceso).

### **6.2.8. Preparación de las membranas modelo y análisis de la unión de las proteínas G.**

Los distintos tipos de membranas modelo que han sido objeto de estudio en esta tesis se prepararon a partir de soluciones de lípidos naturales a una concentración 10 mM, disueltos en una mezcla de cloroformo:metanol 2:1 (v/v). La concentración exacta de fosfolípidos y esfingomielinea en las soluciones de partida se determinó mediante un método de cuantificación, descrito en el apartado 6.2.9.1, y basado en la detección del fósforo presente en cada muestra (Bartlett, 1959; Böttcher et al, 1961; Fiske & Subbarow, 1925). Por su parte, la determinación de la concentración de colesterol en la solución de partida correspondiente, se hizo siguiendo el método desarrollado por Zlatkis et al. (Zlatkis et al., 1953), descrito en el subapartado 6.2.9.2. La concentración final de lípido total en cada una de las mezclas lipídicas obtenidas fue 3 mM. A continuación, se indican las proporciones molares de cada lípido añadido a las distintas mezclas estudiadas: PC:PE (1:1, mol:mol), PC:PE (1:4, mol:mol), PC:PS (4:1, mol:mol), PC:PS (2:1, mol:mol), PC:PE:Cho (1:1:1, mol:mol), PC:PE:Cho:SM (1:1:1:1, mol:mol), PC:PE:PS (2:2:1, mol:mol).

Tras la preparación de las distintas mezclas, el solvente se eliminó mediante exposición de las muestras a un flujo de argón. Como resultado de esto, se formó una fina película lipídica en el fondo de los tubos. El residuo fue sometido a vacío durante al menos 3 horas y, a continuación, las películas lipídicas se hidrataron en tampón 20 mM NaHEPES, conteniendo 100 mM KCl y 0,1 mM EDTA, a pH 7,4. La hidratación se hizo a 42 °C, agitando vigorosamente con vortex. Las vesículas multilamelares

resultantes (*MLVs*) se sometieron a 10 ciclos de congelación y descongelación, y finalmente se obtuvo una población de vesículas unilamelares grandes de 400 nm de diámetro mediante un procedimiento de extrusión. La extrusión se llevó a cabo según el método de Mayer et al. (Mayer et al, 1986), y consistió básicamente en hacer pasar la emulsión de lípidos a través de una membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 400 nm un total de 11 veces, utilizando un “miniextruder” (Avanti Polar Lipids). Las concentraciones finales de lípidos en las muestras de liposomas se determinaron por los métodos ya mencionados de Böttcher et al. (Böttcher et al, 1961) y Zlatkis et al. (Zlatkis et al, 1953).

En los ensayos de unión de proteínas G a membranas modelo, se incubaron los distintos liposomas en presencia de las proteínas G recombinantes objeto de estudio, durante 1 hora, a 25 °C y en agitación a 200 r.p.m. Así, en el caso de las distintas formas de  $G\alpha_i$ , se añadieron 150 ng de proteína a una mezcla de unión con 1 mM liposomas, 20 mM NaHEPES, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 50  $\mu$ M  $GTP\gamma S$ , a pH 7,4. El volumen total de la mezcla fue de 300  $\mu$ l.

En el caso de los heterodímeros  $G\beta\gamma$ , la cantidad de complejo añadida a la mezcla fue de 100 ng. En estos experimentos no se añadió  $GTP\gamma S$  a la mezcla de unión, que en lo demás fue similar a la que se describe para las proteínas monoméricas  $G\alpha$ .

Finalmente, en los ensayos de unión de complejos heterotriméricos  $G\alpha\beta\gamma$  a membranas modelo, la cantidad de complejo añadida a la mezcla fue de 50 ng. Tampoco en estos experimentos se añadió  $GTP\gamma S$ . Los complejos heterotriméricos llevaron unido  $GDP\beta S$ .

La proteína G unida a membranas se separó de la proteína no unida por ultracentrifugación a 90.000 x g, durante 1 hora, a 25 °C, en series experimentales independientes. Los concentrados de membrana resultantes de la ultracentrifugación se resuspendieron en 40  $\mu$ l de tampón de carga de electroforesis (84 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoetanol, 5% glicerol, 0,01% (p/v) de azul de bromofenol) y se hirvieron las muestras durante 3 minutos. A continuación se cargaron en el gel de electroforesis. Las diferentes proteínas G estudiadas se detectaron mediante la técnica de “western-blot”, de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 6.2.10.1.

## 6.2.9. Métodos químicos de cuantificación.

### 6.2.9.1. Cuantificación del fósforo inorgánico.

La cuantificación del fósforo inorgánico es una herramienta fundamental en los experimentos con membranas, ya que permite conocer la cantidad de fosfolípidos que hay en una membrana, ya sea biológica o modelo (LUVs, SUVs...). Para ello, se utilizó el método colorimétrico modificado de Fiske y Subbarow (Bartlett, 1959; Böttcher et al, 1961; Fiske & Subbarow, 1925).

Cada ensayo requirió de la elaboración de una recta patrón que contuvo cantidades conocidas de fósforo inorgánico. En este caso, se hizo una recta con valores comprendidos entre los 0 y 100 nmoles, usando para ello una solución 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Las soluciones necesarias para este método, junto con los pasos a realizar (tabla 6-3), se muestran a continuación:

1. Patrón fosfato: 1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
2. Ácido perclórico 70%.
3. Molibdato 10X: 22 g. heptamolibdato amónico  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$ , 143 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 857 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .
4. Molibdato 1X: diluir 10 veces el molibdato 10X.
5. Ácido ascórbico 10% (p/v) (renovado cada 2-3 semanas).

Inicialmente, se llevó a cabo una digestión con ácido perclórico al 70% (v/v), a 195 °C, añadiendo 500  $\mu\text{l}$  a tubos de 150 x 15 mm. El ácido perclórico, ayudado por la temperatura, digiere las moléculas de fosfolípidos, oxidando el grupo fosfato y transformándolo en fosfato inorgánico. Para que tenga lugar la digestión es suficiente una temperatura superior a 180 °C, durante un mínimo de 45 minutos.

A continuación, se añadieron 4 ml de una solución de molibdato (1X) y 500  $\mu\text{l}$  de ácido ascórbico al 10% (w/v). El fosfato inorgánico reacciona con el molibdato y el ácido ascórbico, dando como resultado una solución amarillenta que deriva en azulada a medida que la cantidad de fósforo aumenta. La reacción discurrió a 100 °C durante 5-6 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de la absorbancia de la

reacción colorimétrica a una  $\lambda=812$  nm, en un lector de fluorescencia *FLUOstar Omega* (BMG LABTECH).

**Tabla 6-3. Pasos para determinar el fósforo soluble por el método de Fiske y Subbarow modificado (Fiske y Subbarow, 1925; Bartlett, 1959; Bötcher y cols., 1961).**

Adiciones	Fiske normal	Fiske reducido
Patrón fosfato 1 mM o muestra	0-100 nmoles	0-25 nmoles
Ácido perclórico 70%	500 $\mu$ l	100 $\mu$ l
	Digestión: >180°C, >40 min	
H <sub>2</sub> O	---	500 $\mu$ l
Molibdato	4 ml (1X)	100 $\mu$ l (10X)
Ácido ascórbico 10%	500 $\mu$ l	100 $\mu$ l
	Reacción colorimétrica: 100°C, 5-6 min	
Medida de absorbancia	812 nm	830 nm

### 6.2.9.2. Ensayo de determinación de colesterol.

El colesterol es un tipo de lípido que, por carecer de fósforo, no puede cuantificarse mediante el método colorimétrico modificado de Fiske y Subbarow anteriormente descrito. Sin embargo, numerosos métodos de determinación de colesterol, tanto químicos como enzimáticos, han sido desarrollados (Zak, 1977; Iburguren et al, 2010). Entre todos ellos, el que se aplicó a la cuantificación de colesterol en las soluciones de partida y en membranas modelo de tipo PC:PE:Cho:SM (1:1:1:1), fue el método desarrollado por Zlatkis, Zak y Boyle (Zlatkis et al, 1953).

A partir de una solución patrón de colesterol en ácido acético al 0,1% (p/v), se construyó una recta de calibración con valores comprendidos entre 0 y 517 nmoles de colesterol.

Las soluciones necesarias para este método se muestran a continuación:

1. Solución patrón de colesterol: colesterol al 0,1% (p/v) en ácido acético.
2. Ácido acético glacial.
3. Solución A: 500 mg FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O en 20 ml de ácido fosfórico al 85%.
4. Agente coloreador: 21 ml de ácido sulfúrico concentrado + 4 ml de solución A.

Todas las soluciones a analizar, la solución del blanco, las de los estándares y las de las muestras problema, se llevaron hasta un volumen final de 3 ml. con ácido acético glacial. Se agitaron los tubos y se esperó 30 minutos a que tuviera lugar la disolución

completa del colesterol. A continuación, se añadieron 2 ml. de agente colorador, se agitó nuevamente cada tubo, y se esperó otros 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura final de la absorbancia a 550 nm.

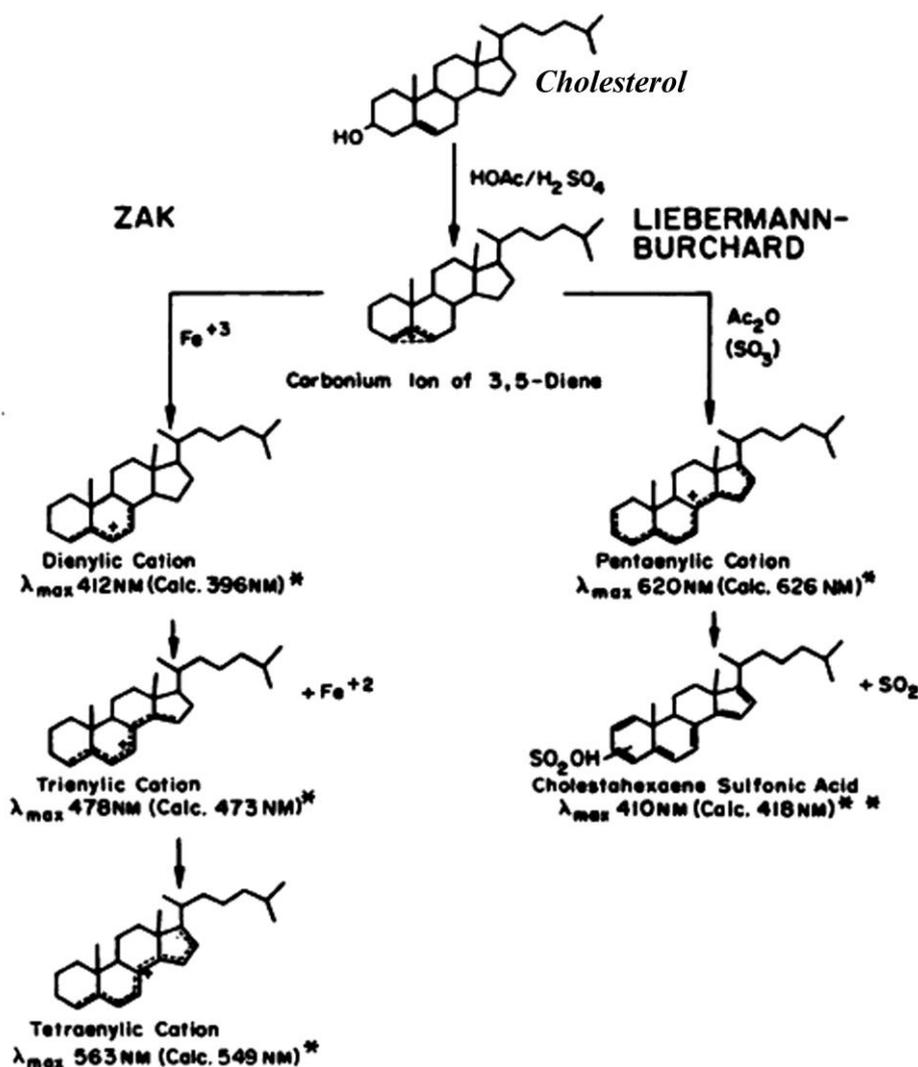


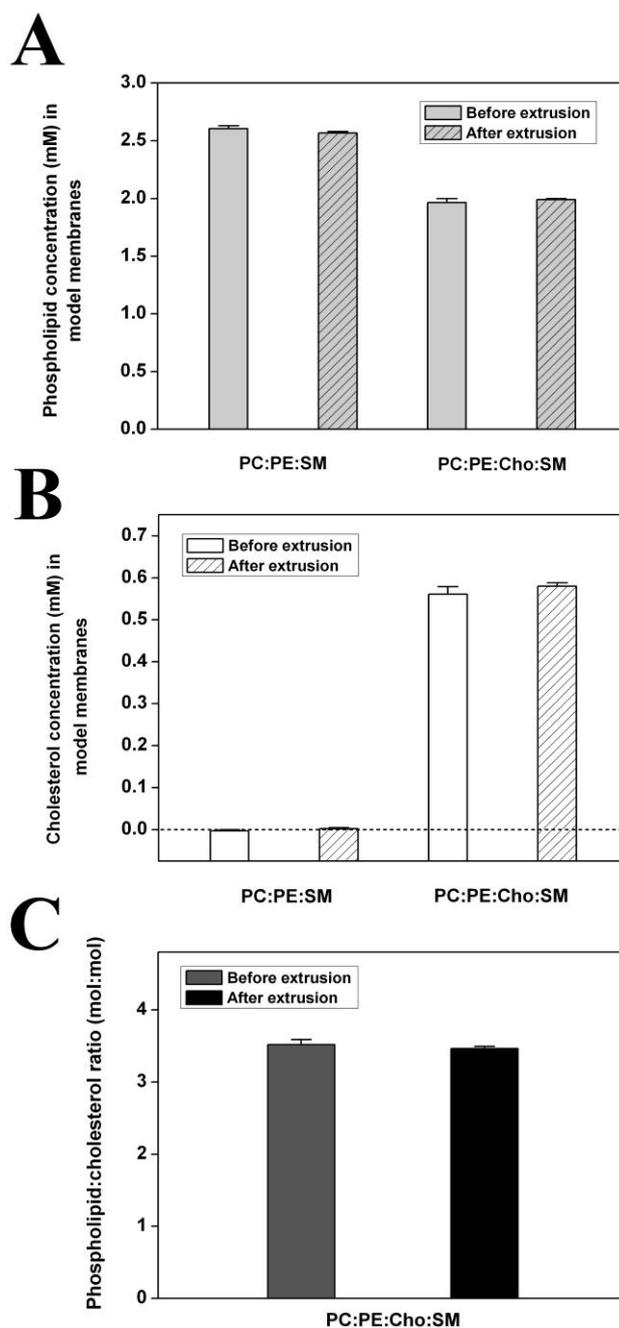
Figura 6-7. Mecanismos de reacción propuestos para los métodos de Zlatkis, Zak y Boyle (a la izquierda) y de Liebermann-Burchard (a la derecha) (adaptado de Burke et al, 1974).

En la reacción de Zlatkis, Zak y Boyle, la presencia de ácido acético y ácido sulfúrico en la mezcla de reacción conduce a la protonación del grupo  $-\text{OH}$  del colesterol y posterior deshidratación, para dar el ion carbonio 3,5-colestadieno (Burke et al, 1974). En un medio muy ácido como el de esta reacción, la deshidratación del colesterol ocurre muy rápido. Una secuencia de oxidaciones sucesivas a partir de este carbocatión, en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ , propicia la formación primero del carbocatión dienil ( $\lambda_{\text{max}} = 412\text{ nm}$ ), a partir del cual se origina el carbocatión trienil ( $\lambda_{\text{max}} = 487\text{ nm}$ ) y, como producto final, el carbocatión tetraenil ( $\lambda_{\text{max}} = 563\text{ nm}$ ). En cada paso de oxidación, se forma la

cantidad equivalente de  $\text{Fe}^{2+}$ , a partir de  $\text{Fe}^{3+}$  (figura 6-7). El resultado, en un espectrofotómetro de luz visible, es la sucesión en el tiempo de tres picos de absorbancia a 412, 478 y 563 nm. La absorbancia máxima a 563 nm en la reacción de Zlatkis, Zak y Boyle, se obtiene típicamente en 30-40 minutos desde el comienzo de la reacción, a 25 °C (Burke et al, 1974). La formación del carbocatión tetraenil deseado requiere la formación de tres dobles enlaces adicionales en la molécula de colesterol (figura 6-7).

Este método se aplicó a la determinación del colesterol presente en membranas modelo de tipo PC:PE:Cho:SM (1:1:1:1), antes y después de la extrusión de los liposomas a través de filtros de policarbonato con un tamaño de poro de 400 nm de diámetro. De acuerdo con los trabajos de Iburguren et al. (Iburguren et al, 2010), la extrusión de vesículas lipídicas que contienen colesterol a través de filtros con un tamaño de poro de 100 nm de diámetro, supone la pérdida de parte del contenido en colesterol presente en las vesículas lipídicas, pérdida que también depende de la composición lipídica de las mismas.

Dada la importancia del colesterol en la formación de dominios con estructura líquido-ordenada, a través de la unión íntima con la esfingomielina, se analizó la presencia de colesterol en vesículas de tipo PC:PE:Cho:SM antes y después de la extrusión, mediante la reacción de Zlatkis, Zak y Boyle. Además, se determinó la concentración total de fosfolípido en esas mezclas mediante el método modificado de Fiske y Subbarow y, de esta manera, se pudo calcular la proporción fósforo:colesterol. Para comprobar el efecto de los fosfolípidos acompañantes en la determinación del colesterol, se aplicó también dicho ensayo a membranas modelo formadas por PC, PE y SM en una proporción 1:1:1.



**Figura 6-8. Análisis del contenido en colesterol de membranas modelo antes y después del proceso de extrusión.** A, determinación del fósforo total presente en muestras con membranas modelo de tipo PC:PE:SM y PC:PE:Cho:SM, antes y después de la extrusión. B, determinación del contenido en colesterol de dichas muestras por el método de Zlatkis, Zak y Boyle. C, proporción fosfolípido:colesterol (mol:mol) en membranas de tipo PC:PE:Cho:SM, antes y después de la extrusión.

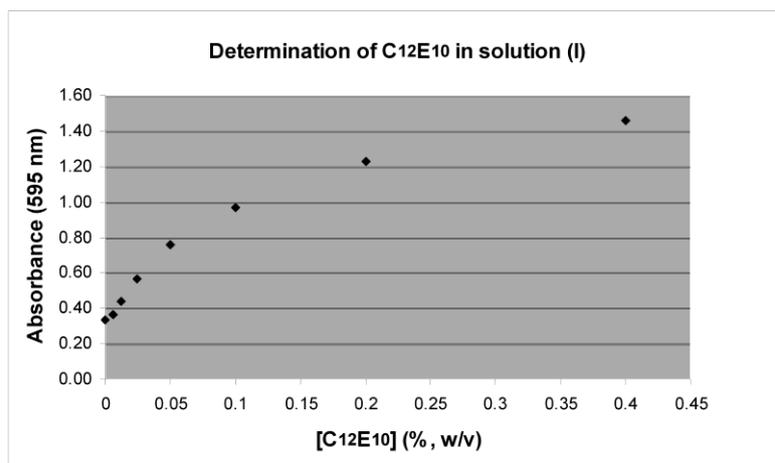
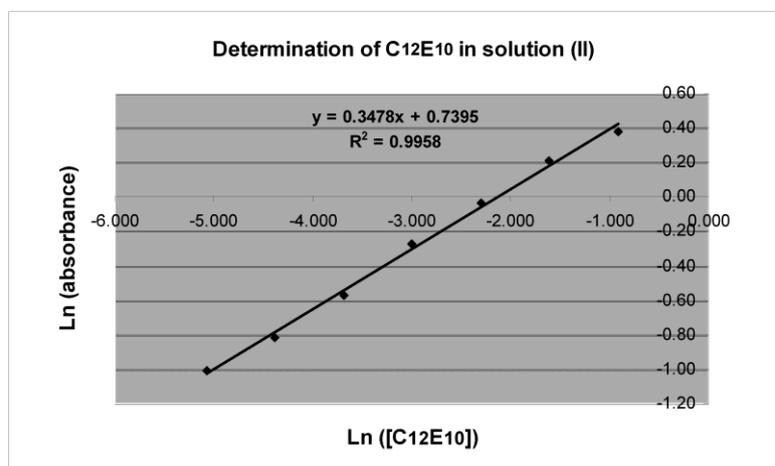
Se observó que tanto en vesículas de tipo PC:PE:SM como de tipo PC:PE:Cho:SM, la concentración de fosfolípido total fue muy similar antes y después de la extrusión (figura 6-8 A). Lo mismo ocurrió cuando se determinó la concentración de colesterol en la mezcla de PC:PE:Cho:SM (figura 6-8 B). Curiosamente, las mezclas constituídas por PC, PE y SM dieron una señal superior al blanco, lo que supuso la existencia de una

pequeña interferencia en la determinación de la concentración de colesterol en los liposomas de interés (figura 6-8 B).

Puesto que la extrusión no afectó al nivel total de fosfolípidos, ni al nivel de colesterol, tampoco la proporción fósforo:colesterol se vio alterada por este procedimiento (figura 6-8 C). Así pues, el problema detectado con la extrusión de determinadas mezclas lipídicas a través de filtros con un poro de 100 nm de diámetro, no se hizo patente en el modelo experimental estudiado y bajo las condiciones de trabajo descritas.

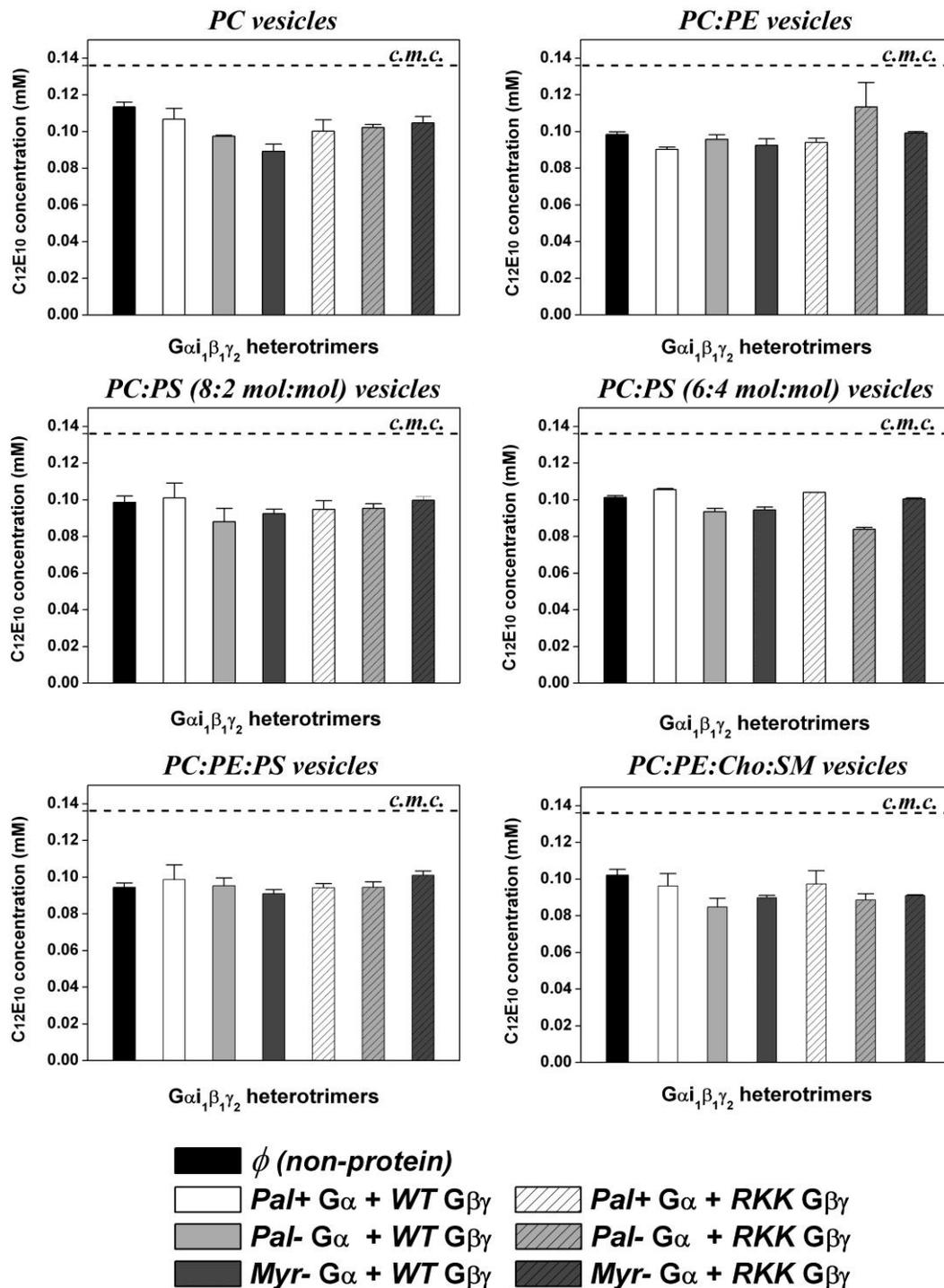
### **6.2.9.3 Aplicación del ensayo de Bradford a la detección de polioxietileno 10 lauril éter en solución.**

El reactivo de Bradford se ha usado ampliamente para la determinación de la concentración de proteínas en solución (Bradford, 1976). Este reactivo es el azul de Coomassie, el cual transita entre dos estados de ionización diferentes: una forma catiónica no unida a la proteína, que le da un color rojo o verde al tinte, y una forma aniónica, de color azul, estabilizada por la unión a la proteína mediante interacciones débiles de tipo fuerzas de van de Waals e interacciones iónicas. La forma del tinte unida a la proteína tiene un máximo de absorbancia a 595 nm. El valor de absorbancia del tinte azulado es proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, existiendo una relación lineal dentro de un rango de valores de concentración de proteína determinados. A efectos de cuantificación proteica, el reactivo de Bradford no es compatible con altas concentraciones de detergentes. Cuando se analizó la absorbancia del reactivo de Bradford en presencia de diferentes concentraciones del detergente polioxietileno 10 lauril éter ( $C_{12}E_{10}$ ), se comprobó que existía una clara relación de dependencia (figura 6-9 A). Una transformación logarítmica de la absorbancia y de la concentración de detergente convirtió la curva sigmoideal de la figura 6-9 en una recta (figura 6-9 B). Se aprovechó este comportamiento para la detección en solución de este detergente, utilizado en la columna cromatográfica durante el proceso de purificación proteica.

**A****B**

**Figura 6-9.** Curvas patrón obtenidas en uno de los ensayos de determinación de la concentración de C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> por el método de Bradford. A, relación de dependencia entre las concentraciones de C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> en distintas soluciones patrón y la absorbancia de cada una de esas muestras, medida a 595 nm. Esta relación no fue lineal. B, relación lineal obtenida a partir de la transformación logarítmica de las variables descritas anteriormente. Este comportamiento fue aprovechado para determinar los niveles de detergente C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> en distintas muestras objeto de estudio.

Un ejemplo de la utilidad práctica de este ensayo fue su aplicación en los estudios de interacción entre los complejos  $G\alpha\beta\gamma$  y las membranas modelo, con objeto de determinar los niveles de detergente no iónico C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> en las diferentes mezclas de unión consideradas (figura 6-10). En todos los casos, la muestra control constituida por las vesículas lipídicas pero sin el complejo heterotrimérico, dio un valor de referencia igual o superior al de las muestras con los diferentes complejos heterotriméricos, para cada una de las membranas modelo estudiadas (figura 6-10).



**Figura 6-10. Detección del detergente  $C_{12}E_{10}$  en mezclas de unión  $G\alpha\beta\gamma$ -LUVs.** En todos los casos, el ruido de fondo obtenido a partir de los valores de absorbancia de las muestras en las que no hubo proteína, equivalente a una concentración hipotética de aproximadamente 0,1 mM de  $C_{12}E_{10}$ , resultó ser el valor de referencia en torno al cual se situaron los demás valores de concentración correspondientes a todas las muestras problema analizadas.

Este método permitió, al menos, descartar una hipotética presencia de detergente  $C_{12}E_{10}$  en una concentración superior a su concentración micelar crítica en las mezclas de unión, cuyo valor aproximado de 0,136 mM fue dado por Hu et al. (Hu et al., 2011).

Más aún, los valores finales de absorbancia parecieron indicar una nula interferencia del detergente  $C_{12}E_{10}$  en los resultados finales de unión de proteínas G heterotriméricas a membranas modelo. En todos los casos, los valores de absorbancia de las muestras problema fueron muy similares a los de las muestras control, carentes éstas últimas de proteína y, por tanto, de  $C_{12}E_{10}$ .

## **6.2.10. Análisis de las interacciones lípido-proteína y proteína-proteína por “Western-blot”.**

### **6.2.10.1. “Western-blot” desnaturalizante.**

Para la detección inmunológica de las proteínas de interés se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, también denominada *SDS-PAGE* (del inglés “Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis”) (Laemmli, 1970). Es la técnica electroforética más comúnmente utilizada para el análisis de proteínas, debido a la capacidad del detergente aniónico SDS de solubilizar, disociar y desnaturalizar proteínas y complejos multiproteicos, dando lugar a cadenas polipeptídicas únicas. El SDS se une a las proteínas de acuerdo con una relación *cantidad de SDS unido : peso molecular de la proteína* constante, de manera que la carga por unidad de masa se vuelve también constante. De esta forma, los complejos SDS-proteína migran hacia el ánodo durante la electroforesis, y su separación electroforética depende únicamente de su masa molecular. La concentración de acrilamida en el gel determina el rango de separación de las proteínas en la electroforesis.

En la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, un hecho crítico es la diferenciación de los geles en dos zonas de pH diferente (Laemmli, 1970). La zona superior, en la que se concentran las muestras, se denomina “stacking” y tiene un pH de 6,8. Está compuesta por un 4% (p/v) de acrilamida-bis-acrilamida. Para formar este gel se preparó una solución que contuvo: 166 mM de Tris HCl, pH 6,8, 0,1% (p/v) de SDS, 0,23% (p/v) de persulfato amónico y 0,083% (v/v) de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina. A continuación del “stacking”, inmediatamente por debajo, se sitúa la zona de separación o "running", compuesta por 8-10% (p/v) de acrilamida-bis-

acrilamida, 1 M de Tris·HCl, pH 8,8, 0,1% (p/v) de SDS, 0,05% (p/v) de persulfato amónico y 0,05% (v/v) de N,N,N',N'- tetrametiletlenodiamina. El pH de este gel de separación es de 8,8. La diferencia de pH entre “running” y “stacking” es fundamental en la concentración de la muestra, primero, en el “stacking”; y, después, en la separación de las proteínas por orden de masa molecular en el “running”. A pH 6,8, la glicina tiene una carga neta de cero, lo que da lugar a un fuerte gradiente de voltaje entre los iones  $\text{Cl}^-$  y la glicina. Las proteínas cargadas negativamente y sometidas a la influencia de este gradiente, se concentran todas ellas a la entrada del gel de separación. A pH 8,8, la glicina adquiere carga neta negativa, desapareciendo ese gradiente electroquímico. Las proteínas migran entonces a través del entramado de poliacrilamida del gel de separación por influencia del campo eléctrico dominante fijado. Las concentraciones de acrilamida en el gel de separación fueron adecuadas para separar proteínas con un peso molecular comprendido entre 15 y 100 kDa. Los geles tuvieron un tamaño de 7 x 10 cm (15 calles) con 1 mm ó 1,5 mm de espesor, y en ellos se cargaron de 15 a 45  $\mu\text{l}$  de muestra. Junto a las muestras se sembraron 5  $\mu\text{l}$  de un estándar coloreado (“Precisión Plus Dual Color”, *Biorad*) con distintas proteínas indicadoras de peso molecular (10-250 kDa). Las electroforesis se llevaron a cabo a un voltaje constante de 90 V durante 30 minutos, para concentrar las muestras en la zona del “stacking”; y, finalmente, se aplicó un voltaje de 120 V durante aproximadamente unos 100 minutos, para separar las proteínas. El tampón de electroforesis estuvo compuesto por 0,3% de Tris base, 1,44% de glicina, y 0,1% de SDS. El pH fue de 8,5 – 8,6 aproximadamente. En todos los experimentos, la electroforesis se detuvo después de la salida del gel del frente de electroforesis, teñido éste con el azul de bromofenol.

Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa aplicando un campo eléctrico perpendicular al plano del gel. Para ello, se pusieron en contacto el gel y la membrana de nitrocelulosa, rodeados de papel de filtro y esponjas que ayudaron a mantenerlos unidos bajo presión en un *casette*. Durante la transferencia, el amperaje constante aplicado fue de 350 mA/gel, y el proceso duró 2 horas y 30 minutos. Para la transferencia se utilizó un tampón compuesto por 0,31% de Tris base, 1,44% de glicina, y 20% (v/v) de metanol, pH 8,3–8,6. Al término de la transferencia y para minimizar la fijación inespecífica del anticuerpo, las membranas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con solución de bloqueo. Este paso y los siguientes variaron dependiendo del sistema de detección proteica empleado.

### *Detección de la proteína por quimioluminiscencia.*

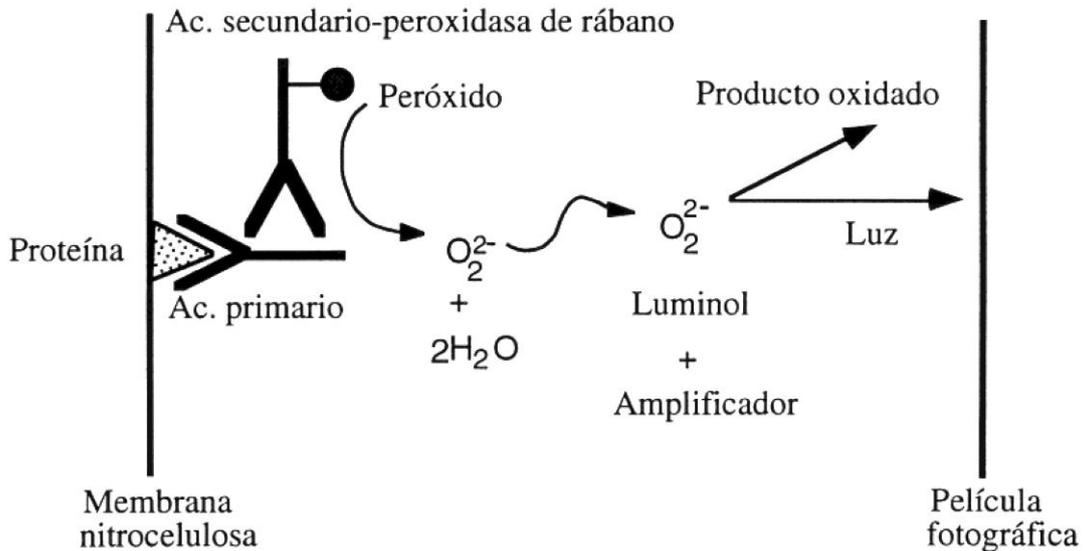
Éste fue el sistema empleado para la detección de las proteínas  $G\alpha$  y  $G\beta$  correspondientes a los distintos complejos heterotriméricos que se usaron en los estudios de unión a membranas modelo (sección 3.2.2. del capítulo 3). También se empleó este sistema en el análisis de la interacción con membranas de células Sf9 de los complejos diméricos y heterotriméricos, obtenidos a partir de la sobreexpresión en dichas células de las proteínas  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\beta_1$  y de la subunidad  $G\gamma_2$  con distintas mutaciones en su región carboxi-terminal (para más detalles ver secciones 2.2.3 y 3.2.3.2).

Cuando la detección de proteína se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia, el bloqueo de las membranas de nitrocelulosa tras la transferencia se hizo con una solución salina tamponada de fosfato (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 12 mM de  $Na_2HPO_4$ , 1,38 mM de  $KH_2PO_4$ , pH 7,4), que contuvo un 5% (p/v) de leche desnatada en polvo, 0,5% (p/v) de albúmina sérica bovina y 0,05% (v/v) de monolaureato de polioxietileno-sorbitan (Tween 20). Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo (diluciones entre 1:100 y 1:5000, dependiendo del anticuerpo), manteniéndolas en suave agitación durante toda la noche, a 4 °C. A continuación, las membranas se lavaron tres veces con PBS. Cada lavado tuvo una duración de 10 minutos. Finalmente, las membranas se incubaron 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano, diluido en la solución de bloqueo (anti-conejo, dilución 1:5000; o anti-ratón, dilución 1:2000). Finalmente las membranas se lavaron tres veces con PBS durante 10 minutos.

La inmunoreactividad se detectó mediante un sistema de quimioluminiscencia. Las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente con el reactivo *ECL* (*Amersham Internacional*), o bien durante 5 minutos con *ECL-PLUS*. En este sistema de detección, la enzima peroxidasa de rábano, conjugada con los anticuerpos secundarios, actúa como catalizador de la oxidación del sustrato luminol en presencia de peróxido de hidrógeno.

Tras esta reacción, el luminol pasa a un estado excitado (estado de alta energía) y vuelve a su estado inicial (estado de baja energía) mediante la emisión de luz por fosforescencia. Un agente fenólico de amplificación se incluye en los reactivos *ECL*, que es capaz de amplificar más de 100 veces la intensidad de luz emitida. La luz

emitida, que presenta un pico máximo en los primeros cinco minutos decayendo después lentamente, se detectó al poner en contacto las membranas de nitrocelulosa con una película fotográfica (*ECL Hyperfilm<sup>TM</sup> Amersham*) (figura 6-11).



**Figura 6-11. Detección de proteínas por quimioluminiscencia utilizando los reactivos ECL.** Las membranas de nitrocelulosa se incubaron en presencia del anticuerpo primario. Después se incubaron en presencia del anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de rábano, que cataliza una reacción en la que se produce luminol. Las señales de quimioluminiscencia se detectaron al incubar las membranas con los reactivos ECL y exponerlas a una película fotográfica.

Los marcadores de peso molecular coloreados, que fueron cargados junto a las muestras en cada gel, se separaron mediante electroforesis y fueron transferidos a la membrana de nitrocelulosa. El peso molecular de cada una de las proteínas de interés se determinó al colocar la película fotográfica impresionada sobre la membrana de nitrocelulosa y calculando su posición en la membrana con respecto a los marcadores de peso molecular.

*Detección de la proteína mediante análisis fluorométrico de infrarrojo cercano.*

Este sistema de detección está basado en la propiedad de ciertas sustancias con máximos de absorbancia a 700 u 800 nm que, tras ser excitadas con luz de ese rango de longitudes de onda, son capaces de emitir radiación en la región del infrarrojo cercano.

Los anticuerpos secundarios empleados en estos experimentos llevaron conjugados este tipo de fluoróforos y el equipo de medición utilizado fue un sistema de detección de radiación infrarroja *ODISSEY*, desarrollado por la compañía *LI-COR Biosciences*. Dicho equipo estuvo provisto de dos canales de luz incidente, uno de 700 nm y el otro de 800 nm, y de un sensor capaz de detectar y registrar la radiación infrarroja procedente de las membranas de nitrocelulosa.

En los estudios de unión de las distintas proteínas  $G\alpha_i$  y de los complejos  $G\beta_1\gamma_2$  a membranas modelo (secciones 1.2 y 2.2.2), se llevó a cabo la detección de proteína por este sistema. También, la caracterización lipídica de las distintas proteínas G estudiadas se hizo empleando este sistema de detección proteica.

Tras la transferencia, se procedió al bloqueo de las membranas de nitrocelulosa en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior, pero empleando en este caso una solución salina tamponada de fosfato (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 12 mM de  $Na_2HPO_4$ , 1,38 mM de  $KH_2PO_4$ , pH 7,4), que contuvo únicamente un 5% (p/v) de leche desnatada en polvo. No se utilizó Tween 20 durante el bloqueo, dado que aumenta considerablemente la señal inespecífica. También, la albúmina contribuye a aumentar el ruido de fondo.

Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo a la que se añadió un 0,1% (v/v) de Tween 20 (diluciones entre 1:100 y 1:5000, dependiendo del anticuerpo), manteniéndolas en suave agitación durante toda la noche, a 4 °C. A continuación, las membranas se lavaron tres veces con PBS conteniendo un 0,1% (v/v) de Tween 20. Cada lavado tuvo una duración de 10 minutos. Finalmente, las membranas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario que llevó conjugado un fluoróforo *IRDye<sup>TM</sup> 800CW* (780 nm, *LI-COR Biosciences*), diluido en solución de bloqueo con un 0,1% (v/v) de Tween 20 y un 0,001% (p/v) de SDS (anti-conejo, dilución 1:5000; anti-ratón, dilución 1:5000). Finalmente se realizaron tres lavados de las membranas, de 10 minutos cada uno, con la solución ya descrita de PBS más Tween 20, y un último lavado de 2-3 minutos con PBS.

La membrana de nitrocelulosa se colocó sobre la pantalla del sistema de detección *ODISSEY* y se expuso a radiación de 700 nm y de 800 nm. Las imágenes obtenidas contuvieron las bandas inmunorreactivas, cuya intensidad dependió de la cantidad de radiación infrarroja asociada a cada una de ellas y detectada por el equipo. Las imágenes finales resultantes del escaneo fueron exportadas en formato \*.tiff, con una

resolución de 300 ppp. La cuantificación fotodensitométrica de las bandas se explica en el siguiente apartado y se hizo de un modo similar a como se cuantificaron las bandas obtenidas por quimioluminiscencia.

### *Cuantificación fotodensitométrica.*

En todos los casos, archivos con formato \*.tiff, conteniendo las imágenes de las bandas inmunorreactivas, fueron analizados mediante el *software* de cuantificación *Total Lab*<sup>®</sup> (*totalab Life Science Analysis Essentials*). Para la cuantificación proteica, la cantidad de proteína de interés se determinó mediante interpolación del valor de densidad óptica de la banda inmunorreactiva, en una curva patrón construida con cantidades crecientes de una proteína G estándar de concentración conocida. Se observó la existencia de una relación lineal entre la cantidad de proteína patrón cargada en distintos pocillos de un mismo gel y los valores de densidad óptica integrada correspondientes. De esta manera, se determinó la cantidad de proteína G unida a un tipo concreto de membrana, y se expresó como los ng de proteína G unida a esa membrana entre los ng de proteína G total de partida introducida en la mezcla de unión. Otra forma de representar la unión de proteínas G a membranas fue mediante porcentajes de unión relativos, respecto a un valor de unión de referencia del 100% a un tipo determinado de membrana, que generalmente correspondió a la unión de las proteínas estudiadas a vesículas de PC.

### **6.2.10.2. “Western-blot” no desnaturalizante.**

En este tipo de “western-blot” se llevó a cabo una electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, excluyendo el SDS de los geles y de los tampones de electroforesis y de carga. Las muestras tampoco contuvieron  $\beta$ -mercaptoetanol, ni se hirvieron. De esta manera, los complejos heterodiméricos  $G\beta_1\gamma_2$  y los complejos heterotriméricos  $G\alpha_1\beta_1\gamma_2$ , se mantuvieron intactos.

En este caso, se preparó un único gel de pH 8,8. Este gel estuvo compuesto por: 8% (p/v) de acrilamida-bis-acrilamida, 0,7 M de Tris-HCl pH 8,8, 0,175% (p/v) de persulfato amónico y 0,063% (v/v) de N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina. El tampón de carga 10X en el que se diluyeron las muestras contuvo 120 mM de Tris HCl pH 6,8,

50% (v/v) de glicerol y 0,01% (p/v) de azul de bromofenol. El tampón de electroforesis usado fue el mismo que el del “western-blot” desnaturizante, pero sin SDS.

En el caso de los dímeros  $G\beta_1\gamma_2$ , la electroforesis duró 3 horas a un voltaje constante de 80 V. En el caso de los heterotrímeros  $G\alpha_{i1}\beta_1\gamma_2$ , la duración de la electroforesis fue de 5 horas. La transferencia duró toda la noche y se hizo a 4°C y a 35 V, utilizando para ello un tampón de transferencia idéntico al del “western-blot” desnaturizante. Los pasos siguientes se hicieron tal y como se describió anteriormente para la detección de proteína mediante análisis fluorométrico del infrarrojo cercano. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti- $G\alpha_{i1/i2}$  (dilución 1:1000), anti- $G\beta_1$  (dilución 1:100) y anti- $G\gamma_2$  (dilución 1:100). Los anticuerpos secundarios llevaron conjugado el fluoróforo *IRDye<sup>TM</sup> 800CW* (780 nm, *LI-COR Biosciences*) y se utilizaron a una dilución 1:4000.

### **6.2.11. Tinción de geles de poliacrilamida con azul de Coomassie.**

Los geles en los que se separaron proteínas o complejos de proteínas, se tiñeron con 3 mM de azul de Coomassie, disuelto en agua:metanol:ácido acético (40:50:10). Los geles se dejaron en la solución de tinción durante toda la noche, en suave agitación. Al día siguiente, se destiñieron con una solución de agua:metanol:ácido acético (87,5:5:7,5) (Watterson et al, 1976). Tras 5-6 lavados de 1 hora a 60 °C con la solución de desteñir, los geles se secaron utilizando el equipo “Gel Drying Kit” (*Invitrogen*), y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **6.2.12. Modelado informático.**

La predicción de la estructura secundaria de las regiones N-terminal de  $G\alpha_{i1}$  y C-terminal de  $G\gamma_2$  se llevó a cabo con el servidor *Psi-Pred* (Jones, D.T., 1999).

Un alineamiento de las secuencias correspondientes a la región N-terminal de las distintas proteínas  $G\alpha$  miristoiladas de rata se hizo utilizando la herramienta informática *Clustal W (1.81)*. También se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias de las distintas proteínas  $G\gamma_2$  humanas conocidas. En estos alineamientos, el carácter “\*” indica posiciones en la secuencia en las que existe un residuo completamente conservado. El carácter “:”, por su parte, indica la presencia de sustituciones

conservativas, en las que las cadenas laterales de los aminoácidos alineados tienen propiedades químicas muy similares. Un tercer símbolo es un punto, “.”, para indicar la presencia de sustituciones semiconservativas, en las que hay un menor grado de similitud entre aminoácidos.

Se obtuvieron proyecciones bidimensionales de la hélice  $\alpha$  N-terminal de  $G\alpha_{i1}$  y de la hélice C-terminal de  $G\gamma_2$  por medio del servidor *HELIQUEST* (Gautier et al., 2008). La imagen resultante se almacenó en formato \*.jpg.

Para determinar el efecto de los ácidos mirístico y palmítico en el ordenamiento estructural de los cinco primeros aminoácidos de  $G\alpha_{i1}$  *WT*,  $G\alpha_{i1}$  *Myr*<sup>-</sup> y  $G\alpha_{i1}$  *Pal*<sup>-</sup>, se utilizó la herramienta informática *MMFF94 molecular mechanics*. Esta aplicación permitió resolver las configuraciones estructurales más estables de esos distintos péptidos en el vacío. El estudio se llevó a cabo usando el *software ChemBio 3D Ultra 12.0* de la compañía *Perkin Elmer* (anteriormente *CambridgeSoft*).

Los perfiles de hidrofobicidad de proteínas  $G\gamma_2$  con distintas mutaciones en su región C-terminal, representados en la escala Kyte-Doolittle, se obtuvieron de la página <http://www.vivo.colostate.edu/molkit/hydropathy/index.html>.

### **6.2.13. Análisis estadístico de los datos.**

Se utilizó el *software Origin 8.0* para el análisis estadístico de los datos y la construcción de los gráficos. Los resultados mostrados son los valores de la media  $\pm$  error estándar del número de experimentos indicado (*n*). Las diferentes muestras se compararon utilizando un test de análisis de la varianza (*ANOVA*) o bien, un test *t* de Student de dos muestras de datos no emparejados. Las diferencias entre los grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ .

## BIBLIOGRAFÍA

Abankwa D, Vogel H (2007) A FRET map of membrane anchors suggests distinct microdomains of heterotrimeric G proteins. *J Cell Sci* **120**(Pt 16): 2953-2962

Aicart-Ramos C, Valero RA, Rodríguez-Crespo I (2011) Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim Biophys Acta* **1808**(12): 2981-2994

Alemanly R, Terés S, Baamonde C, Benet M, Vögler O, Escribá PV (2004) 2-hydroxyoleic acid: a new hypotensive molecule. *Hypertension* **43**(2): 249-254

Barceló F, Prades J, Encinar JA, Funari SS, Vögler O, González-Ros JM, Escribá PV (2007) Interaction of the C-terminal region of the Ggamma protein with model membranes. *Biophys J* **93**(7): 2530-2541

Bartlett GR (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem* **234**: 466-468

Bhatnagar RS, Gordon JI (1997) Understanding covalent modifications of proteins by lipids: where cell biology and biophysics mingle *Trends Cell Biol* **7**: 14-20

Bigay J, Faurobert E, Franco M, Chabre M (1994) Roles of lipid modifications of transducin subunits in their GDP-dependent association and membrane binding. *Biochemistry* **33**(47): 14081-14090

Bijlmakers MJ, Marsh M (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* **13**(1): 32-42

Böttcher CJF, van Gent CM, Pries C (1961) A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Analytica Chimica Acta* **24**: 203-204

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

Brown DA, London E (1997) Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem Biophys Res Commun* **240**(1): 1-7

Burke RW, Diamondstone BI, Velapoldi RA, Menis O (1974) Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clin Chem* **20**(7): 794-801

Busconi L, Boutin PM, Denker BM (1997) N-terminal binding domain of Galpha subunits: involvement of amino acids 11-14 of Galphao in membrane attachment. *Biochem J* **323**: 239-244

Busconi L, Denker BM (1997) Analysis of the N-terminal binding domain of Go alpha. *Biochem J* **328**: 23-31

- Buser CA, Sigal CT, Resh MD, McLaughlin S (1994) Binding membrane of myristoylated peptides corresponding to the NH<sub>2</sub> terminus of Src. *Biochemistry* **33**(44): 13093-13101
- Buss JE, Mumby SM, Casey PJ, Gilman AG, Sefton BM (1987) Myristoylated alpha subunits of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7493-7497
- Cadwallader KA, Paterson H, McDonald SG, Hancock JF (1994) N-terminally myristoylated Ras proteins require palmitoylation or a polybasic domain for plasma membrane localization. *Mol Cell Biol* **14**(7): 4722-4730
- Carlson KE, Woolkalis MJ, Newhouse MG, Manning DR (1986) Fractionation of the  $\beta$  subunit common to guanine nucleotide-binding regulatory proteins with the cytoskeleton. *Mol Pharmacol* **30**: 463-468
- Casey PJ (1995) Protein lipidation in cell signaling. *Science* **268**(5208): 221-225
- Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* **98**(1): 69-80
- Conklin BR, Bourne HR (1993) Structural elements of G $\alpha$  subunits that interact with G $\beta\gamma$ , receptors, and effectors. *Cell* **73**: 631-641
- Crouthamel M, Thiyagarajan M, Evanko DS, Wedegaertner PB (2008) N-terminal polybasic motifs are required for plasma membrane localization of G $\alpha$ s and G $\alpha$ q. *Cell Signal* **20**(10):1900-1910
- Crouthamel M, Abankwa D, Zhang L, DiLizio C, Manning DR, Hancock JF, Wedegaertner PB (2010) An N-terminal Polybasic Motif of G $\alpha$ q Is Required For Signaling and Influences Membrane Nanodomain Distribution. *Mol Pharmacol* **78**(4): 767-777
- Degtyarev MY, Spiegel AM, Jones TLZ (1994) Palmitoylation of a G Protein  $\alpha_i$  Subunit Requires Membrane Localization Not Myristoylation. *J Biol Chem* **269**(49): 30898-30903
- Downes GB, Gautam N (1999) The G protein Subunit Gene Families. *Genomics* **62**: 544-552
- Drisdel RC, Green WN (2004) Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation. *Biotechniques* **36**: 276-285
- Duncan JA, Gilman AG (1996) Autoacylation of G protein alpha subunits *J Biol Chem* **271**(38): 23594-23600
- Dunphy JT, Greentree WK, Manahan CL, Linder ME (1996) G-protein palmitoyltransferase activity is enriched in plasma membranes. *J Biol Chem* **271**(12): 7154-7159

Dunphy JT, Greentree WK, Linder ME (2001) Enrichment of G-protein Palmitoyltransferase Activity in Low Density Membranes. *J Biol Chem* **276**(46): 43300-43304

Dupré DJ, Robitaille M, Rebois RV, Hébert TE (2009) The Role of Gβγ Subunits in the Organization, Assembly, and Function of GPCR Signaling Complexes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 31-56

Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schönle A, Hell SW (2009) Direct observation of the nanoscale dynamic of membrane lipids in a living cell. *Nature* **457**: 1159-1162

Emoto K, Kobayashi T, Yamaji A, Aizawa H, Yahara I, Inoue K, Umeda M (1996) Redistribution of phosphatidylethanolamine at the cleavage furrow of dividing cells during cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12867-12872

Escribá PV, Sastre M, García-Sevilla JA (1995) Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7595-7599

Escribá PV, Ozaita A, Ribas C, Miralles A, Fodor E, Farkas T, García-Sevilla JA (1997) Role of lipid polymorphism in G protein-membrane interactions: nonlamellar-prone phospholipids and peripheral protein binding to membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**(21): 11375-11380

Escribá PV (2006) Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol Med* **12**(1): 34-43

Escribá PV, Wedegaertner PB, Goñi FM, Vögler O (2007) Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim Biophys Acta* **1768**(4): 836-852

Escribá PV, González-Ros JM, Goñi FM, Kinnunen PK, Vigh L, Sánchez-Magraner L, Fernández AM, Busquets X, Horváth I, Barceló-Coblijn G (2008) Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med* **12**(3): 829-875

Epand RM, Fuller N, Rand RP (1996) Role of the position of unsaturation on the phase behaviour and intrinsic curvature of phosphatidylethanolamines. *Biophys J* **71**: 1806-1810

Evanko DS, Thiagarajan MM, Wedegaertner PB (2000) Interaction with Gbetagamma is required for membrane targeting and palmitoylation of Galpha(s) and Galpha(q). *J Biol Chem* **275**: 1327-1336

Farkas T, Kitajka K, Fodor E, Csengeri I, Lahdes E, Yeo YK, Krasznai Z, Halver JE (2000) Docosahexaenoic acid-containing phospholipids molecular species in brains of vertebrates. *Proc Natl Acad Sci* **97**: 6362-6366

Fishburn CS, Herzmark P, Morales J, Bourne HR (1999) Gβγ and Palmitate Target Newly Synthesized Gα<sub>z</sub> to the Plasma Membrane. *J Biol Chem* **274**(26): 18793-18800

Fishburn CS, Pollitt SK, Bourne HR (2000) Localization of a peripheral membrane protein: Gbetagamma targets Galpha(Z). *Proc Natl Acad Sci* **97**: 1085-1090

Fiske CH, Subbarow I (1925) Determination of Phosphorus. *J Biol Chem* **66**: 375-400  
Funari S, Prades J, Escribá PV, Barceló F (2005) Farnesol and geranylgeraniol modulate the structural properties of phosphatidylethanolamine model membranes. *Mol Membr Biol* **22**(4): 303-311

Galbiati F, Volonte D, Meani D, Milligan G, Lublin DM, Lisanti MP, Parenti M (1999) The dually acylated NH<sub>2</sub>-terminal domain of g $\alpha$  is sufficient to target a green fluorescent protein reporter to caveolin-enriched plasma membrane domains. Palmitoylation of caveolin-1 is required for the recognition of dually acylated g-protein  $\alpha$  subunits in vivo. *J Biol Chem* **274**(9): 5843-5850

Garab G, Lohner K, Laggner P, Farkas T (2000) Self-regulation of the lipid content of membranes by non-bilayer lipids: a hypothesis. *Trends Plant Sci* **5**(11): 489-494

García-Regalado A, Guzmán-Hernández ML, Ramírez-Rangel I, Robles-Molina E, Balla T, Vázquez-Prado J, Reyes-Cruz G (2008) G Protein-coupled Receptor-promoted Trafficking of G $\beta_1\gamma_2$  Leads to AKT Activation at Endosomes via a Mechanism Mediated by G $\beta_1\gamma_2$ -Rab11a Interaction. *Mol Biol Cell* **19**: 4188-4200

García Sevilla JA (ed) (1996) *Receptores para neurotransmisores*: Ediciones en Neurociencias, S.L., 408 pp

Gautam N, Downes GB, Yan K, Kisselev O (1998) The G-Protein  $\beta\gamma$  Complex. *Cell Signal* **10**(7): 447-455

Gautier R, Douguet D, Anntony B, Drin G (2008) HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific  $\alpha$ -helical properties. *Bioinformatics* **24**(18): 2101-2102

Ghomashchi F, Zhang X, Liu L, Gelb MH (1995) Binding of prenylated and polybasic peptides to membranes: affinities and intervesicle exchange. *Biochemistry* **34**(37): 11910-11918

Giorgione J, Epand RM, Buda C, Farkas T (1995) Role of phospholipids containing docosahexaenoyl chains in modulating the activity of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9767-9770

Goud B, Gleeson PA (2010) TGN golgins, Rabs and cytoskeleton: regulating the Golgi trafficking highways. *Trends Cell Biol* **20**: 329-336

Gruner SM (1985) Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(11): 3665-3669

Gutkind JS. (2000) Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Networks by G Protein-Coupled Receptors. *Sci STKE* **40**: 1-14

Heo WD, Inoue T, Park WS, Kim ML, Park BO, Wandless TJ, Meyer T (2006) PI(3,4,5)P<sub>3</sub> and PI(4,5)P<sub>2</sub> Lipids Target Proteins with Polybasic Clusters to the Plasma Membrane. *Science* **314**(5804): 1458-1461

Herrmann R, Heck M, Henklein P, Kleuss C, Hofmann KP, Ernst OP (2004) Sequence of interactions in receptor-G protein coupling. *J Biol Chem* **279**(23): 24283-24290

Hessel E, Heck M, Müller P, Herrmann A, Hofmann KP (2003) Signal Transduction in the Visual Cascade Involves Specific Lipid-Protein Interactions. *J Biol Chem* **278**(25): 22853-22860

Hildebrandt JD, Codina J, Risinger R, Birnbaumer L (1984) Identification of a gamma subunit associated with the adenylyl cyclase regulatory proteins Ns and Ni. *J Biol Chem* **259**(4): 2039-2042

Honigsmann A, van den Bogaart G, Iraheta E, Risselada HJ, Milovanovic D, Mueller V, Müller S, Diederichsen U, Fasshauer D, Grubmüller H, Hell SW, Eggeling C, Kühnel K, Jahn R (2013) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment. *Nat Struct Mol Biol* **20**(6): 679-686

Hope HR, Pike LJ (1996) Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzyme in detergent-insoluble lipid domains. *Mol Biol Cell* **7**: 843-851

Hope MJ, Cullis PR (1979) The bilayer stability of inner monolayer lipids from the human erythrocyte. *FEBS Lett* **107**(2): 323-326

Hu C, Li R, Yang H, Wang J (2011) Properties of binary surfactant systems of non-ionic surfactants C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>E<sub>23</sub>, and C<sub>12</sub>E<sub>42</sub> with a cationic gemini surfactant in aqueous solutions. *J Colloid Interface Sci* **356**: 605-613

Huang C, Hepler JR, Chen LT, Gilman AG, Anderson RG, Mumby SM (1997) Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol Biol Cell* **8**(12): 2365-2378

Huang C, Duncan, JA, Gilman, AG, Mumby, SM (1999) Persistent membrane association of activated and depalmitoylated G protein  $\alpha$  subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 412-417

Hurley JB, Simon MI, Teplow DB, Robishaw JD, Gilman AG (1984) Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. *Science* **226**(4676): 860-862

Ibarguren M, Alonso A, Tenchov BG, Goñi FM (2010) Quantitation of cholesterol incorporation into extruded lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1798**(9): 1735-1738

Israelachvili JN, Marcelja S, Horn RG (1980) Physical principles of membrane organisation. *Quart Rev Biophys* **13**: 121-200

Itzen A, Goody RS (2011) GTPases involved in vesicular trafficking: structures and mechanisms. *Sem Cell Dev Biol* **22**: 48-56

Iyengar R, Birnbaumer L (1990) *G proteins*. San Diego, California: Academic Press, Inc.

Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol* **292**(2): 195-202

Jones TL, Simonds WF, Merendino JJ, Jr., Brann MR, Spiegel AM (1990) Myristoylation of an inhibitory GTP-binding protein alpha subunit is essential for its membrane attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2): 568-572

Jones TLZ, Degtyarev MY, Backlund PS (1997) The Stoichiometry of  $G\alpha_s$  Palmitoylation in Its Basal and Activated States. *Biochemistry* **36**(23): 7185-7191

Kaiser HJ, Lingwood D, Levental I, Sampaio JL, Kalvodova L, Rajendran L, Simons K (2009) Order of lipid phases in model and plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(39): 16645-16650

Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, Eehalt R, Verkade P, Drechsel D, Simons K (2005) Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J Biol Chem* **280**(44): 36815-36823

Kirk GL, Gruner SM, Stein DL (1984) A Thermodynamic Model of the Lamellar to Inverse Hexagonal Phase Transition of Lipid Membrane-Water Systems. *Biochemistry* **23**: 1093-1102

Kisselev O, Gautam N (1993) Specific interaction with rhodopsin is dependent on the gamma subunit type in a G protein. *J Biol Chem* **268**(33): 24519-24522

Kisselev O, Pronin A, Ermolaeva M, Gautam N (1995) Receptor-G protein coupling is established by a potential conformational switch in the beta gamma complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(20): 9102-9106

Kitajka K, Martínez E, Miralles A, Escribá PV (2002) Role of phosphatidylethanolamine in G protein-coupled receptor-associated signal transduction. *Adv Exp Med Biol* **507**: 491-496

Klemm RW, Ejsing CS, Surma MA, Kaiser HJ, Gerl MJ, Sampaio JL, de Robillard Q, Ferguson C, Proszynski TJ, Shevchenko A, Simons K (2009) Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J Cell Biol* **185**(4): 601-612

Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW (1987) Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene Coding for the Human Platelet  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptor. *Science* **238**: 650-656

Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 794-807

Kosloff M, Elia N, Selinger Z (2002) Structural homology discloses a bifunctional structural motif at the N-termini of G alpha proteins. *Biochemistry* **41**(49): 14518-14523

- Kozasa T, Gilman AG (1995) Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. *J Biol Chem* **270**(4): 1734-1741
- Krishna AG, Menon ST, Terry TJ, Sakmar TP (2002) Evidence That Helix 8 of Rhodopsin Acts as a Membrane-Dependent Conformational Switch. *Biochemistry* **41**(26): 8298-8309
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685
- Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP (1995) Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J Biol Chem* **270**(26): 15693-15701
- Linder ME, Middleton P, Hepler JR, Taussig R, Gilman AG, Mumby SM (1993) Lipid modifications of G proteins:  $\alpha$  subunits are palmitoylated. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 3675-3679
- Lingwood D, Kaiser HJ, Levental I, Simons K (2009) Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 5): 955-960
- Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**(5961): 46-50
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper F, Neer EJ, Clapham DE (1987) The  $\beta\gamma$  subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic  $K^+$  channel in heart. *Nature* **325**: 321-326
- Lohner K (1996) Is the high propensity of ethanolamine plasmalogens to form non-lamellar lipid structures manifested in the properties of biomembranes? *Chem Phys Lipids* **81**(2): 167-184
- Lowe CR (ed) (1979) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. An Introduction to Affinity Chromatography*. Imperial College, London: Elsevier Biomedical Press
- Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* **67**(8): 4566-4579
- Mabrey S, Mateo PL, Sturtevant JM (1978) High-sensitivity scanning calorimetric study of mixtures of cholesterol with dimyristoyl- and dipalmitoylphosphatidylcholines. *Biochemistry* **17**(12): 2464-2468
- Marrari Y, Crouthamel M, Irannejad R, Wedegaertner PB (2007) Assembly and Trafficking of Heterotrimeric G Proteins. *Biochemistry* **46**(26): 7665-7677
- Matsuzaki K, Sugishita K, Ishibe N, Ueha M, Nakata S, Miyajima K, Epanand RM (1998) Relationship of membrane curvature to the formation of pores by magainin 2. *Biochemistry* **1998**(37): 11856-11863

- Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR (1986) Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta* **858**(1): 161-168
- McLaughlin S, Wang J, Gambhir A, Murray D (2002) PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**: 151-175
- McLaughlin S, Murray D (2005) Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature* **438**: 605-611
- McMahon HT, Kozlov MM, Martens S (2010) Membrane curvature in synaptic vesicle fusion and beyond. *Cell* **140**: 601-605
- Medkova M, Preininger AM, Yu N, Hubbel WL, Hamm HE (2002) Conformational changes in the amino-terminal helix of the G protein  $\alpha_{i1}$  following dissociation from G $\beta\gamma$  subunit and activation. *Biochemistry* **41**(31): 9962-9972
- Melkonian KA, Ostermeyer AG, Chen JZ, Roth MG, Brown DA (1999) Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J Biol Chem* **274**(6): 3910-3917
- Michaelson D, Ahearn I, Bergo M, Young S, Philips M (2002) Membrane Trafficking of Heterotrimeric G Proteins via the Endoplasmic Reticulum and Golgi. *Mol Biol Cell* **13**: 3294-3302
- Mixon MB, Lee E, Coleman DE, Berghuis AM, Gilman AG, Sprang SR (1995) Tertiary and quaternary structural changes in G $_{i\alpha 1}$  induced by GTP hydrolysis. *Science* **270**: 954-960
- Moffett S, Brown DA, Linder ME (2000) Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J Biol Chem* **275**(3): 2191-2198
- Morales J, Fishburn CS, Wilson PT, Bourne HR (1998) Plasma membrane localization of G $\alpha_z$  requires two signals. *Mol Biol Cell* **9**: 1-14
- Morris AJ, Malbon CC (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* **79**(4): 1373-1430
- Mumby SM, Casey PJ, Gilman AG, Gutowski S, Sternweis PC (1990) G protein gamma subunits contain a 20-carbon isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15): 5873-5877
- Munro S (2005) The Golgi apparatus: defining the identity of Golgi membranes. *Curr Opin Cell Biol* **17**: 395-401
- Muntz KH, Sternweis PC, Gilman AG, Mumby SM (1992) Influence of gamma subunit prenylation on association of guanine nucleotide-binding regulatory proteins with membranes. *Mol Biol Cell* **3**(1): 49-61

Murray D, McLaughlin S, Honig B (2001) The role of electrostatic interactions in the regulation of the membrane association of G protein beta gamma heterodimers. *J Biol Chem* **276**(48): 45153-45159

Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**: 297-300

Neer EJ (1995) Heterotrimeric G Proteins: Organizers of Transmembrane Signals. *Cell* **80**: 249-257

Neer EJ, Smith TF (1996) G Protein Heterodimers: New Structures Propel New Questions. *Cell* **84**: 175-178

Oh P, Schnitzer JE (2001) Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell* **12**(3): 685-698

Ohnishi S, Ito T (1974) Calcium-induced phase separations in phosphatidylserine-phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry* **13**(5): 881-887

Pedone KH, Hepler JR (2007) The importance of N-terminal polycysteine and polybasic sequences for G14alpha and G16alpha palmitoylation, plasma membrane localization and signaling function. *J Biol Chem* **282**(35): 25199-25212

Peitzsch RM, McLaughlin S (1993) Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**(39): 10436-10443

Peng L, Mirshahi T, Zhang H, Hirsch JP, Logothetis DE (2003) Critical Determinants of the G Protein  $\gamma$  Subunits in the G $\beta\gamma$  Stimulation of G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium (GIRK) Channel Activity. *J Biol Chem* **278**(50): 50203-50211

Pike LJ, Casey L (1996) Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J Biol Chem* **271**(43): 26453-26456

Pike LJ, Miller JM (1998) Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. *J Biol Chem* **273**(35): 22298-22304

Pike LJ, Han X, Chung KN, Gross RW (2002) Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* **41**(6): 2075-2088

Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**: 655-667

Polozov IV, Polozova AV, Molotkovski JG, Epand RM (1997) Amphipathic peptide affects the lateral domain organization of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1328**: 125-139

- Qian S, Huang HW (2012) A novel phase of compressed bilayers that models the prestalk transition state of membrane fusion. *Biophys J* **102**: 48-55
- Reiter E & Lefkowitz RJ (2006) GRKs and  $\beta$ -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends End Met* **17**(4): 159-165
- Resh MD (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**(1): 1-16
- Rocks O, Gerauer M, Vartak N, Koch S, Huang Z-P, Pechlivanis M, Kuhlmann J, Brunsveld L, Chandra A, Ellinger B, Waldmann H, Bastiaens PIH (2010) The Palmitoylation Machinery Is a Spatially Organizing System for Peripheral Membrane Proteins. *Cell* **141**: 458-471
- Rothman JE, Lenard J (1977) Membrane asymmetry. *Science* **195**(4280): 743-753
- Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF (2000) Differential targeting of beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway. *J Biol Chem* **275**(52): 41447-41457
- Saini DK, Kalyanaraman V, Chisari M, Gautam N (2007) A Family of G Protein  $\beta\gamma$  Subunits Translocate Reversibly from the Plasma Membrane to Endomembranes on Receptor Activation. *J Biol Chem* **282**(33): 24099-24108
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schwindinger WF, Robishaw JD (2001) Heterotrimeric G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation. *Oncogene* **20**: 1653-1660
- Schertler GF, Villa C, Henderson R (1993) Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362**: 770-772
- Segev N (2011) GTPases in intracellular trafficking: An overview. *Sem Cell Dev Biol* **22**: 1-2
- Seykora JT, Myat MM, Allen LA, Ravetch JV, Aderem A (1996) Molecular determinants of the myristoyl-electrostatic switch of MARCKS. *J Biol Chem* **271**(31): 18797-18802
- Sigal CT, Zhou W, Buser CA, McLaughlin S, Resh MD (1994) Amino-terminal basic residues of Src mediate membrane binding through electrostatic interaction with acidic phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12253-12257
- Simonds WF (1999) G protein regulation of adenylyl cyclase. *Trends Pharmacol Sci* **20**(2): 66-73
- Simons K, van Meer G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**(17): 6197-6202

- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**(6633): 569-572
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**(4023): 720-731
- Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P, Hawkins PT (1997) The G $\beta\gamma$  Sensitivity of a PI3K Is Dependent upon a Tightly Associated Adaptor, p101. *Cell* **89**: 105-114
- Sternweis PC (1986) The purified alpha subunits of Go and Gi from bovine brain require beta gamma for association with phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **261**(2): 631-637
- Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**(5913): 474-477
- Tang X, Sun Z, Runne C, Madsen J, Domann F, Henry M, Lin F, Chen S (2011) A Critical Role of G $\beta\gamma$  in Tumorigenesis and Metastasis of Breast Cancer. *J Biol Chem* **286** (15): 13244-13254
- Taussig R, Iñiguez-Lluhi JA, Gilman AG (1993) Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha. *Science* **261**(5118): 218-221
- Tu Y, Wang J, Ross EM (1997) Inhibition of brain Gz GAP and other RGS proteins by palmitoylation of G protein alpha subunits. *Science* **278**(5340): 1132-1135
- van der Wel P, Pott T, Morein S, Greathouse D, Koeppe R, Killian J (2000) Tryptophan-anchored transmembrane peptides promote formation of nonlamellar phases in phosphatidylethanolamine model membranes in a mismatch-dependent manner. *Biochemistry* **39**(11): 3124-3133
- Veatch SL, Keller SL (2005) Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys Rev Lett* **94**(14): 148101
- Vereb G, Szollosi J, Matko J, Nagy P, Farkas T, Vigh L, Matyus L, Waldmann TA, Damjanovich S (2003) Dynamic, yet structured: The cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 8053-8058
- Vögler O, Casas J, Capó D, Nagy T, Borchert G, Martorell G, Escribá PV (2004) The Gbetagamma dimer drives the interaction of heterotrimeric Gi proteins with nonlamellar membrane structures. *J Biol Chem* **279**(35): 36540-36545
- Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iñiguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR (1995) The Structure of the G Protein Heterotrimer Gi $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 2. *Cell* **83**: 1047-1058
- Watterson DM, Harrelson WG Jr, Keller PM, Sharief F, Vanaman TC (1976) Structural similarities between the Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory proteins of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase and actomyosin ATPase. *J Biol Chem* **251**(15): 4501-4513

Wedegartner PB, Wilson PT, Bourne HR (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem* **270**(2): 503-506

Wilschut J, Duzgunes N, Papahadjopoulos D (1981) Calcium/magnesium specificity in membrane fusion: kinetics of aggregation and fusion of phosphatidylserine vesicles and the role of bilayer curvature. *Biochemistry* **20**(11): 3126-3133

Wilson PT, Bourne HR (1995) Fatty acylation of  $\alpha_z$ . *J Biol Chem* **270**(16): 9667-9675

Yan K, Gautam N (1997) Structural Determinants for Interaction with Three Different Effectors on the G Protein  $\beta$  Subunit. *J Biol Chem* **272**(4): 2056-2059

Yang Q, Alemany R, Casas J, Kitajka K, Lanier SM, Escribá PV (2005) Influence of the Membrane Lipid Structure on Signal Processing via G Protein-Coupled Receptors. *Mol Pharmacol* **68**: 210-217

Yeagle PL, Albert AD (2007) G-protein coupled receptor structure. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 808-824

Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) Partitioning of Lipid-Modified Monomeric GFPs into Membrane Microdomains of Live Cells. *Science* **296**(5569): 913-916

Zak B (1977) Cholesterol methodologies: a review. *Clin Chem* **23**(7): 1201-1214

Zlatkis A, Zak B, Boyle AJ (1953) A new method for the direct determination of serum cholesterol. *J Lab Clin Med* **41**(3): 486-492

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM (2004) Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1636**(2-3): 119-128