



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Characterization of the Structure and
Function of the Rabphilin 3A**

**Caracterización de la Estructura
y Función de la Rabfilina 3A**

D^a María Dolores Pérez Sánchez

2017



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR (A)

**CARACTERIZACIÓN DE LA
ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE
LA
RABFILINA 3A**

MARÍA DOLORES PÉREZ SÁNCHEZ

MEMORIA

Presentada para optar al grado de Doctor con Mención
Internacional

2017



**UNIVERSITY OF
MURCIA**

DEPARTMENT OF
BIOCHEMISTRY AND
MOLECULAR BIOLOGY (A)

**CHARACTERIZATION OF
THE STRUCTURE AND
FUNCTION OF THE
RABPHILIN 3A**

MARÍA DOLORES PÉREZ SÁNCHEZ
2017

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

PRÓLOGO (RESUMEN EN INGLÉS)	1
I. INTRODUCTION AND OBJETIVES	3
II. MATHERIALS AND METHODS	4
II.1.- Expression and Purification of Rabphilin 3A and Mutants	4
II.2.- Expression and Purification of SNAP25, STX1A-H3 and VAMP2	5
II.3.- Lipid Sedimentation Assay	6
II.4.- Isothermal Titration Calorimetry (ITC)	6
III. CALCIUM BINDING OF RABPHILIN 3A C2 DOMAINS.	7
IV. CHARACTERIZATION OF LIPID BINDING OF RABPHILIN3A	8
V.- AGGREGATION DRIVEN BY TANDEM C2AB RABPHILIN 3A	8
VI.- INTERACTION OF RABPHILIN 3A WITH SNARE COMPLEX	9
VII.- CONCLUSIONS and OUTLOOK	11

ABREVIATURAS

CAPÍTULO I. Introducción y Objetivos	15
1.- DOMINIOS C2	17
1.1.- Estructura dominios C2	18
1.2.- Sitio de unión a Ca ²⁺ en los dominios C2	21
1.3.- Sitio de unión a lípidos	30
1.4.- Influencia de la orientación de los dominios cuando forman el tandem C2AB	34
2.- FOSFATIDIL INOSITOL 4,5 BISFOSFATO	35
3.- DOMINIOS C2 Y FUSIÓN DE MEMBRANAS	39
4.- COMPLEJO SNARE	46

4.1.- Syntaxina 1	46
4.2.- SNAP25	47
4.3.- Sinaptobrevina/VAMP2	48
5.- RABFILINA 3A y el COMPLEJO SNARE	49
6.- OBJETIVOS	50

CAPÍTULO II. Técnicas y Métodos generales.

1.-MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	55
1.1.-Medios de Cultivo	55
1.2.-Antibióticos	55
1.3.- Transformación Bacteriana	56
1.4.- Vectores de Expresión	57
1.4.1.-pET28a	58
1.4.2.-pET28b	59
1.5.- Electroforesis de Ácidos Nucleicos	60
1.6.- Determinación de la concentración de ADN	61
1.7.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mutagénesis Dirigida	61
1.8.- Clonación de STX1A y VAMP2	65
2.-MÉTODOS BIOQUÍMICOS	
2.1.- Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico. SDS-PAGE	65
2.2.-Tinción de geles con Coomassie	67
2.3.- Determinación de la Concentración de Proteínas	
2.3.1.- Espectroscopía UV. Absorbancia a 280 nm	67
2.3.2.- Espectroscopía de Infrarrojo (IR)	68
2.4.- Cromatografía	69
2.4.1.- Cromatografía de afinidad de unión a metal (IMAC)	70
2.4.2.- Cromatografía de filtración en gel	70
2.5.- Preparación de Mezclas Lipídicas	71
2.5.1.- Vesículas Multilamelares (MLV)	71

2.5.2.- Vesículas Unilamelares Pequeñas (SUV)	71
2.6.- Determinación de la Concentración de Lípidos	71
3.-EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	72
3.1.- Expresión y Purificación de Rabfilina 3A y sus mutantes	73
3.2.- Expresión y Purificación de SNAP25	75
3.3.- Expresión y Purificación de STX1A y VAMP2	76
4.- TÉCNICAS	
4.1.- Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)	77
4.1.1.- Ecuaciones utilizadas para el ajuste de los datos de ITC	80
4.1.1.1.- Modelo de unión a un tipo único de sitios idénticos	80
4.1.1.2.- Modelo de unión a dos tipos de sitios independientes	81
4.1.1.3.- Modelo de unión a sitios secuenciales	82
4.2.- Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)	85
4.3.- Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR)	90
4.4.- Microscopía Electrónica de Transmisión	93
4.5.- Ensayos de Sedimentación Lipídica	

CAPÍTULO III. Caracterización de la unión de calcio a los dominios C2 de Rabfilina 3A.

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017".

1.- RESUMEN	97
2.- INTRODUCCIÓN	98
3.- RESULTADOS	
3.1.- Unión de calcio a los dominios C2A y C2B de Rabfilina 3A	101
3.2.- Unión de calcio al dominio en tándem C2AB de Rabfilina 3A	105
3.3.- Relación entre la capacidad de unión a calcio y residuos aminoacídicos concretos del dominio C2AB de Rabfilina 3A	107
3.3.1.- Mutación D429N	109

3.3.2.- Mutación D484N/D486N	110
3.3.3.- Mutación D641N/D643N	111
3.3.4.- Mutación E539A/E540A	112
3.3.5.- Mutación K666A/K673A/K675A	113
4.- DISCUSIÓN	115

CAPÍTULO IV. Caracterización de la Interacción de Rabfilina 3A con la membrana lipídica.

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017".

1.- RESUMEN	125
2.- INTRODUCCIÓN	127
3.- RESULTADOS	
3.1.- Estructura del dominio C2B de Rabfilina 3A unido a PI(4,5)P ₂	130
3.2.- Interacción de los dominios aislados C2A y C2B de Rabfilina 3A a membranas modelo formadas por POPC/POPS/PI(4,5)P ₂ mediante experimentos de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)	131
3.3.- Interacción del dominio en tándem C2AB de Rabfilina 3A con membranas modelo formadas por POPC/POPS/PI(4,5)P ₂ mediante experimentos de ITC	133
3.4.- Función de la región en lisinas en la interacción del dominio C2AB de Rabfilina 3A con membranas modelo mediante ITC.	138
3.5.- Capacidad de unión a membranas compuestas por POPC/PI(4,5)P ₂ de C2AB de Rabfilina 3A y los mutantes afectados en la región rica en lisinas	141
3.6.- Capacidad de unión a membranas compuestas por POPC/POPS de C2AB de Rabfilina 3A	144
3.7.- Función de la región de unión de Ca ²⁺ en la interacción con el dominio C2AB de Rabfilina 3A	145
3.8.- Efecto de las mutaciones en la región de unión entre los dominios C2A y C2B del tándem para unir vesículas compuestas por POPC/POPS/PI(4,5)P ₂	148
3.9.- Efecto de las mutaciones en la hélice α (hélice H2) del dominios C2B de Rabfilina 3A en su interacción con PI(4,5)P ₂	150
4.- DISCUSIÓN	152

CAPÍTULO V. El dominio C2AB de Rabfilina 3A es capaz de producir agregación de vesículas lipídicas.

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017".

1.- RESUMEN	161
2.- INTRODUCCIÓN	162
3.-RESULTADOS	
3.1.- La capacidad de agregación del dominio C2AB depende de calcio	165
3.1.1.- Efecto de mutaciones en la región rica en lisinas en la capacidad de agregación	165
3.1.2.- Efecto de mutaciones en la región de unión a calcio en la capacidad de agregación	166
3.1.3.- Efecto de mutaciones en la zona del conector entre los dominios C2A y C2B de Rabfilina 3A en la capacidad de agregación	167
3.1.4.- Efecto de mutaciones en la hélice α (hélice H2) del dominio C2B de Rabfilina 3A en la capacidad de agregación	169
3.1.5.- α -Hélice (hélice H2) del dominio C2B de rabfilina 3A en la agregación	170
3.2.- Efecto del calcio en la capacidad de agregación del dominio C2AB de Rabfilina 3A caracterizado mediante Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)	171
3.2.1.- Determinación del radio y anchura media de los agregados formados en las construcciones mutadas en la zona rica en lisinas	171
3.2.2.- Determinación del radio y anchura media de los agregados formados en las construcciones mutadas en la unión a calcio	172
3.2.3.- Determinación del radio y anchura media de los agregados formados por las construcciones mutadas en la zona de unión entre el dominio C2A y C2B de Rabfilina 3A	173
3.2.4.- Determinación del radio y anchura media de los agregados formados por las construcciones afectadas en la hélice H2 del dominio C2B de Rabfilina 3A	175
3.3.- Efecto de las mutaciones combinadas: capacidad de formación de agregados formados por las construcciones mutantes combinadas	179
3.3.1.- Determinación del radio y anchura media de los agregados formados por las construcciones mutantes combinadas	179
3.3.2.- Análisis de las construcciones mutantes combinadas mediante ITC.	181

3.4.- Caracterización de la agregación de los liposomas conducida por C2AB de Rabfilina 3A mediante Microscopía Electrónica de Transmisión	183
4.- DISCUSIÓN	185

CAPÍTULO VI. Interacción de Rabfilina 3A con el complejo SNARE

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017".

1.- RESUMEN	191
2.- INTRODUCCIÓN	192
3.- RESULTADOS	
3.1.- Estructura de C2B-Rabfilina 3A con SNAP25	194
3.2.- Comparación de las estructuras con otras homólogas	195
3.3.- Caracterización de la Interacción entre C2AB de Rabfilina 3A y SNAP25	197
3.4.- Efecto de las mutaciones en los residuos implicados en la interacción entre C2AB de Rabfilina 3A y SNAP25	199
3.5.- Los mutantes en H2 no afectan a la capacidad de unión de C2AB de Rabfilina 3A a membranas	202
3.6.- Importancia de la región rica en lisinas del dominio C2AB de Rabfilina 3A en la unión a PI(4,5)P ₂ y SNAP25	204
3.7.- Interacción de C2AB de Rabfilina 3A con SNAP25/STX1A-H3 y SNAP25/STX1A-H3/VAMP2	205
3.8.- Caracterización mediante Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR) de la interacción entre C2AB de Rabfilina 3A y SNAP25	207
4.- DISCUSIÓN	209

CAPÍTULO VII. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

1.- DISCUSIÓN GENERAL	215
2.-CONCLUSIONES	219
BIBLIOGRAFÍA	223

A mis padres Fermín y Loli
a mi hermano y mi sobrina Ana

a mis abuelos

A José Antonio

*"Sólo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden llegar a saber lo lejos que pueden ir"*

(T.S. Elliot)

"Porque al que tiene, se le dará más y abundará; y al que no tiene, aun aquello que tiene, le será quitado" (Mateo 25; 29-30).

Esta parábola no parece justa, siéndolo más la segunda ley de la termodinámica por la que donde hay diferencias de energía, ésta se redistribuye en el sistema hasta conseguir que todo sea homogéneo. Pero la vida ignora esta ley y sigue la parábola. Si no se invierte en mejorar las estructuras propias para ser cada vez más competitivo, pronto, hasta lo poco que se tiene se perderá.

El escribir estas palabras supone el culmen de un sueño, con pesadillas incluidas, para mí. Termina una etapa que empezó con la misma incertidumbre que comienza la siguiente, espero que sea al menos igual de apasionante que han sido estos últimos años en mi vida.

Quiero mostrar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, el Dr. D. Juan C. Gómez Fernández y la Dra. Senena Corbalán-García por permitirme trabajar en su proyecto y su apoyo durante estos años. Especialmente me gustaría agradecer a Marisén por abrirme las puertas a este mundo y descubrir realmente lo que me gusta hacer, aquello por lo que las horas no pasan y disfruto (y quien ha estado conmigo lo sabe) cada momento. En este tiempo he aprendido gracias a ti que en ciencia el tiempo deja de existir y que un buen resultado es capaz de ocultar tantos y tantos experimentos que no salen como se espera, de todos ellos, de los buenos y los malos se aprende. Los buenos resultados son fruto de la perseverancia, de la capacidad de superación y de la pasión con la que cada día se afrontan nuevos retos. Muchas gracias Marisén, estos años me han servido para mucho, además de formarme como profesional, algo que espero poder demostrar, he aprendido lecciones en la vida que jamás olvidaré y qué sin duda me permitirán afrontar mi futuro de un modo diferente al que me enfrentaría si no te hubiera conocido.

Quisiera agradecer a los profesores y profesoras del departamento de bioquímica y biología molecular que siempre han estado dispuestos a ayudarme en que lo he necesitado. Así como al personal del Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Murcia a los que debo agradecer su ayuda tanto laboral como personal, muy en especial a Alejandro Torrecillas. Muchas gracias Alejandro, por tu ayuda y por tu paciencia estos años.

Al grupo del Dr. Sabatto D'Auria por permitirme trabajar en su laboratorio, y a los miembros de su grupo, especialmente Antonio y Alessandro por su ayuda con el SPR, grazie mille per tutto.

He tenido la suerte de compartir durante estos años poyatas y experiencias con diferentes personas, científica y personalmente hablando. De cada una de ella siempre te quedas con algo, a todos ellos con los que he compartido sitio, comida, conversaciones os doy las gracias por aportar vuestro granito de arena en hacer este tiempo mejor. Ana María, Fran, Álvaro, Marcos (gracias por enseñarme la jerga de los jóvenes), Victoria (muchas gracias por toda la información transmitida, la académica y el resto), Alfonso. A nuestro compi Alessio, muchas gracias por tu ayuda en la aventura Avellino! y por los cafés para llevar en la cantina! A las chicas de la operación Miura, Mar, Victoria y Tere, gracias por los raticos, qué aunque menos de los que nos hubiera gustado, hemos pasado. A los vecinos de enfrente, Anabel y Rubén, gracias. A los que desde la distancia siempre han estado dispuestos a echar una mano, Antonio y Jaime, gracias!

Esta última etapa ha sido dura y me han acompañado en ella, Consuelo, Sonia, Emilio, David y mi compañero del "protein group", Jesus, a ti sobre todo por aguantar mis locuras y mis charlas transcendentales en inglés y español! Mucha suerte a todos en vuestra vida profesional y personal, porque lo valéis. Por último, a Tere, mi compañera de batalla estos últimos años, siempre dispuesta a ayudar en todo, compañera y buena gente donde las haya. Te deseo lo mejor del mundo a nivel profesional y personal, no por nada, porque es lo justo!

A mis amigos y amigas de Jumilla, muchas gracias por los cafetillos de los sábados! Gracias por compartir tantos momentos, muy poca gente tiene la suerte de contar con amigas como yo. A mi otra familia, a María Jesús, a mi tía, mis primos, a todos los que de alguna forma siempre estáis ahí!

A mis padres, Fermín y Loli, porque les tengo que agradecer todo en la vida, su esfuerzo constante para que yo cumpliera mis sueños por absurdos que les parecieran. A mi hermano, apoyo en silencio toda la vida y a su hija, esa pequeña gran revolución que hace que esta vida tenga sentido.

Esta tesis va dedicada a las personas que se fueron y dejaron un hueco en mi corazón, a vosotros os mando todos los besos (que son gratis) que no os puedo dar.

A José Antonio, si hoy estoy aquí es por él. Gracias por el "ahora no podemos desfallecer...", no existen palabras que expresen todo lo que tengo que agradecerte, sólo que si volviera a nacer pasaría por lo mismo para volverte a conocer. Gracias por ser mi compañero en la vida.

ENGLISH REPORT

I. INTRODUCTION AND OBJETIVES.

Membrane fusion is a key process in eukaryotic cells as it facilitates the transport of molecules between cells. One of the most studied systems for membrane fusion is the calcium dependent fusion of synaptic vesicles, cell degranulation and hormone release (*Südhof, 2013*). The vesicle fusion machinery is formed by the SNARE complex. This set of proteins consists of the plasma membrane SNAREs, SNAP25 and syntaxin 1A and the vesicular SNARE protein synaptobrevin, VAMP2. These proteins form a parallel four-stranded helix bundle called “coiled-coil”. The formation of this trans alpha-helical ternary complex drive membrane fusion (*Weber et al., 1998*). This mechanism imply the participation of many proteins involved in approaching the synaptic vesicles to the plasma membrane (docking) and keep the vesicle ready (priming) (*Jahn & Fasshauer, 2012; Josep Rizo & Xu, 2015*). The fusion process is triggered by a rise in the intracellular calcium concentration (*Südhof, 2013*). The major calcium sensors in calcium-triggered exocytosis are the C2 domains (*Walter et al., 2011*).

C2 domains are presents in more than 120 different proteins, which perform a wide of variety of functions, most of them are involved in membrane trafficking and fusion and in signal transduction. These domains are widespread in eukaryotes and they are capable of mediating membrane binding and perform protein-protein interactions through different regions in their structures. The C2 domains display two functional regions: the Ca^{2+} binding region and the polybasic cluster. The former is located in the flexible top loops, and is able to bind 2 or 3 Ca^{2+} ions and interacts with POPS. The polybasic cluster is located at the concave surface of the C2 domain formed by strands $\beta 3$ and $\beta 4$. This region binds specifically to $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ (*Verdaguer et al., 1999*). The 3D structures combined with a detailed analysis have allowed researchers to find key residues in the different interactions. Despite the progress, the mechanism of interaction with membrane or their roles in many cellular processes are still under debate.

Rabphilin 3A is a membrane traffic protein involved in the calcium-dependent regulation of secretory vesicles in neurons and neuroendocrine cells. The

N-terminal part consists of a cysteine-rich Zn²⁺. The protein is target to synaptic or secretory vesicle through the interaction interaction with the small GTPases Rab3A and Rab27, via its N-terminal Rab binding domain (*Fukuda et al., 2004; McKiernan et al., 1996*). The C-terminal is formed by a tandem of C2 domains, C2A and C2B responsible for the Ca²⁺ and phospholipid binding properties and also participate in other protein-protein interactions. The C2B is able to interact with SNAP25 to regulate the docking step of dense core vesicle in PC12 and to limit the re-priming of new vesicles during synaptic depression recovery in embryonic hippocampal neurons (*Tsuboi & Fukuda, 2005; Deák et al., 2006*).

I.2.- OBJETIVES.

- 1.- Calcium binding of the rabphilin 3A C2 domains. Characterization of calcium binding of the isolated rabphilin 3A C2 domains and tandem C2AB domain.
- 2.- Lipid binding of the rabphilin 3A. Influence of lipid composition on the binding of rabphilin 3A to the liposome membrane.
- 3.-Agregation driven by tandem C2AB domain of rabphilin 3A in response to calcium.
- 4.-Characterization of interaction of rabphilin 3A with SNARE complex.

CHAPTER II.-MATERIALS AND METHODS.

II.1.-EXPRESSION AND PURIFICATION OF RABPHILIN 3A and MUTANTS.

The DNA construct was first transformed into *E.coli* BL21 (DE3) electrocompetent cells. These cells were resuspended in 1 ml LB and incubated at 37°C on a tabletop thermal shaker for 1 hour. The transformed bacteria were plated on a LB plate containing the antibiotic, kanamycin and incubated at 37 °C 16 hours. A colony is picked from this plate and inoculated in LB containing kanamycin 50 µg/ml and incubated overnight in a shaking incubator at 37°C.

The expression of the protein was done in a 2 litres Erlenmeyer flask containing 500 ml of LB with Kan (50 µg/ml) and the culture was incubated at 37 °C until confluence OD₆₀₀=0.6-0.8, at which point it was induced with 0.5 mM IPTG

English report

and left 6 hours at 30°C. The cells were harvested by centrifugation, 10000 xg for 30 minutes at 4 °C. The medium was discarded and the bacterial pellet was resuspended in PBS buffer. This resuspended pellet was stored in the -80 °C freezer.

In order to purify, the frozen pellet was thawed before adding 1 mM PMSF, 10 mM benzamidine, 10 µg/ml trypsin inhibitor in lysis buffer that contained 25 mM Hepes 300 mM NaCl. Then the suspension was sonicated to break open the cells (10 times/10 seconds each one). The mix was centrifuged at 15000 rpm during 30 minutes in a ultracentrifuge. The supernatant flew through it in a column with Ni²⁺-agarose, HisGravi Trap (GE Healthcare) and 6xHis-C2AB eluted with a gradient of imidazol (50-500 mM). The fractions containing the C2AB domain were pulled and desalted in a HP2610 column (GE Healthcare) in ÄKTA pure FPLC equilibrated with 25 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl. The 6xHis-tag was removed by thrombin cleavage. The C2AB domain was incubated with p-aminobenzamidine resin, and after that the protein was concentrated using an Ultrafree-10K centrifugal filter unit (Millipore Inc., Bedford, MA) and finally polished in a HiLoad 16/60 S75 (GE Healthcare) pre-equilibrated with 25 mM Hepes 7.4 100 mM NaCl.

II.2.- EXPRESSION AND PURIFICATION OF SNAP25, STX1A-H3 and VAMP2.

The cDNA construct was cloned into pET15b and the proteins were expressed in BL21 (DE3) *E.coli* cells. The protocol was similar to prior section. The bacterial culture was induced when the OD₆₀₀ arrived 0.6-0.8 and then was induced for 6 hour at 25 °C with 0.5 mM IPTG. The cells were lysed by sonication in lysis buffer, 25 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl, 1mM DTT, containing protease inhibitors, 10 mM benzamidine, 1 mM PMSF and 10 µg/ml trypsin inhibitor. The soluble fraction of the lysate was separated through a HisGraviTrap column (GE Healthcare) and the 6xHis-SNAP25, 6xHis-STX1A-H3 and 6x-VAMP2 were eluted with a gradient of imidazol (50-500 mM). The fractions containing the proteins were pulled and desalted in a HP26/10 column (GE Healthcare) to a final buffer 25 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl 1mM DTT. 6xHis-tags were removed by thrombin cleavage. The proteins were incubated with p-aminobenzamidine resin and concentrated using an Ultrafree-5 centrifugal filter unit (Millipore Inc., Bedford,

MA). Finally the proteins were polished on a Superdex 200 10/300 GL column (GE Helthcare) that was pre-equilibrated with 25 mM Hepes pH 7.4 100 mM NaCl, 1 mM DTT buffer.

II.3.- LIPID SEDIMENTATION ASSAY.

Chloroform solutions composed of POPC/POPS/PI(4,5)P₂ (65:25:10) were mixed and dried under a stream of liquid nitrogen gas and the dried under vacuum for 3 hours. The dried lipids were suspended. The concentration of phosphoinositide was chosen in base recent investigations that using super-resolution stimulated-emission depletion microscopy (STED) have detected highly enriched microdomains at sites of synaptic vesicles exocytosis (*Geert van den Bogaart et al., 2011*). For the lipid sedimentation assay, the Rph3A-C2AB and SNAP25 were mixed and incubated for 5 min at 25°C, then 1 mM lipid vesicles were added to the mixture and incubated for 5 minutes at 25°C. After this period of incubation the mixture were centrifuged at 34000xg for 20 minutes. The soluble fraction, supernatants, were separated from the pellet, lipid-bound fraction, and analyzed in 17% SDS-PAGE gels stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. Quantification was performed using the Analyze/Gels plugging of FIJI-ImageJ (*Schindelin et al., 2012*).

II.4.-ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY (ITC).

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) allows the determination of thermodynamic binding parameters of a chemical reaction. The calorimeter consists of an adiabatic jacket with two coin-shaped called the simple and reference cell. The reference cell contains water and the simple cell contains the protein to study. A computer-controlled, auto-titrating syringe inserts with stirrer into the simple cell the ligand solution. During the titration of the ligand into the macromolecule solution in the simple cell, the temperature difference between the simple and reference cell is measure and the amount of electrical power input ($\mu\text{cal/sec}$) needed to keep the simple cell temperature equal to the reference cell. This assay allows determine the thermodynamic parameters, ΔG , ΔS and ΔH . The peaks obtained by the difference

power measurements are fitted using non-linear least squares fitting with binding models that reflect the binding of the ligand to the macromolecule.

Lipid and calcium binding to the C2 domains was studied by ITC using Microcal MCS microcalorimeter (Microcal Inc., Northampton, MA). The experiments with calcium as a ligand were carried out at 25°C and the titration of 274 μM of C2AB with 14 mM CaCl_2 in 25 mM Hepes pH 7.4, 100 mM NaCl. The titration was done by injecting 5 μl of the ligand solution 54 times into the macromolecule solution in the simple cell with a spacing of 400 seconds between the injections and the stirring speed of 260 rpm. For the study of binding of lipid with C2AB the amount of protein was of 11 μM with 6 mM of mix of POPC/POPS/PI(4,5) P_2 . The titration was done by injection 15 μl of the ligand solution 19 times into the macromolecule solution in the simple cell with a spacing of 300 seconds between the injections and the stirring speed of 260 rpm. The ITC raw data were analyzed using Origin 5.0 software.

CHAPTER III.-CALCIUM BINDING OF THE RABPHILIN 3A C2 DOMAINS.

C2 domains bind calcium by the Calcium Binding Region (CBR). Isothermal Titration Calorimetry assays have demonstrated that the isolated C2A domain is able to bind 2 or 3 calcium ions with low affinity and the absorption of energy is due to the endothermic chemical reaction. Isolated C2B domain binds 2 calcium ions with high affinity and exothermic reaction. In order to confirm the role of these domains, the calcium titration was also studied by using the tandem C2AB rabphilin 3A wild type and also the tandem construct with either one or both C2 domains rendered inactive through site-mutagenesis on the calcium binding site. Titrating calcium into rabphilin 3A wild type protein showed an endothermic reaction similar to isolated C2B domain. Mutants containing mutations in aspartate residues located in the CBR render the tandem domain inactive. Mutations to neutralize other residues in the linker and the α -helix indicated that calcium binding only occurred at the calcium binding jaws of the C2 domains of rabphilin 3A.

CHAPTER IV: CHARACTERIZATION OF THE LIPID BINDING OF RABPHILIN 3A.

Calcium binding to the C2 domains induces a subsequent binding to negatively charged phospholipids, such as POPS and PI(4,5)P₂. The main aim of this section was to study the effect of lipid membrane composition and the effect of calcium in the interaction of C2AB rabphilin 3A to the membrane.

The analysis with ITC of liposome binding to the isolated C2A and C2B domain in the presence of Ca²⁺ demonstrated that a combination of POPS and PI(4,5)P₂ in the membranes rendered the higher binding affinity and suggested that one molecule of phosphoinositide might bind per domain. The binding reaction for the C2B domain was endothermic with slightly lower affinity than the C2A domain with an exothermic behaviour. Isothermal titration calorimetry (ITC) was used to measure the affinities of the tandem C2AB rabphilin 3A towards POPS and PI(4,5)P₂. Different mutants were used to characterize the binding process. The polybasic lysine patch of the C2A domain is the primary binding site of PI(4,5)P₂ because the polybasic lysine patch of C2B is blocked by C2A domain in tandem C2AB. The experiments were carried out in the presence and absence of calcium. Calcium increases the affinity of rabphilin 3A towards PI(4,5)P₂ by neutralizing negative charge at the calcium binding site.

CHAPTER V: V.-AGGREGATION DRIVEN BY TANDEM C2AB RABPHILIN 3A.

Calcium-sensitive rabphilin 3A are thought to participate in the fusion of secretory vesicles with the target membrane. Liposome aggregation driven by C2 domains in response to calcium has been confirmed by turbidity assay, Dynamic light-scattering and transmission electron microscopy negative staining (TEM).

Dynamic Light Scattering (DLS) and turbidity assays determined the ability to induce liposomal aggregation when the C2AB domain was added. Mutants were generated to demonstrate that the principal region of interaction between protein and vesicles is α -helix located in C2B domain. The orientation of the C2AB tandem is

the key to properly bind to the vesicles and the plasma membrane. The loop 1 of CBR of C2A domain set up interactions with the residues located in the helix H2 of C2B domain and that interactions contribute to keep the appropriate orientation of the tandem, C2A domain would interact with PI(4,5)P₂ by LRC while C2B domain would interact with the vesicle by the residues located in the H2-helix.

In order to examine if rabphilin 3A induces membrane curvature, small unilamellar vesicles (SUVs) were incubated with C2AB rabphilin 3A in the absence or presence of calcium, and it has been observed that the C2AB domain efficiently induced vesicle fusion of small vesicles in a calcium dependent manner.

VI.- INTERACTION OF RABPHILIN 3A WITH SNARE COMPLEX.

C2AB rabphilin 3A operate in cooperation with PI(4,5)P₂ and Ca²⁺ to bind membrane adopting a conformation compatible to interact with SNAP25, SNAP25/STX1A-H3 and SNAP25/STX1A-H3/VAMP2. The crystal structure C2B-Rph3A with SNAP25 reveals a calcium-independent binding interface between the α -helix of C2B domain with the Nt region of SNAP25. It has performed sedimentation assays and determined that the residues located in the α -helix (H2-helix) are crucial to interact with SNAP25 and the polybasic region located in the β 3 and β 4 strand of the domains are necessary for the phosphoinositide interaction with the plasma membrane. The C2B-Rph3A/SNAP25 would explain that rabphilin 3A acts as a brake to control vesicle re-priming after depletion of the ready release pool (RRP). The complex Rph3A/SNAP25 or Rph3A/SNAP25-STX1A-H3 are located at the active zone and slowdown the recovery of synaptic vesicles.

VII.-CONCLUSION AND OUTLOOK.

This Doctoral Thesis is an attempt at dissecting the function of rabphilin 3A. Current knowledge is highly ambiguous due to the many controversies surrounding this protein. Several biochemical and biophysical assays were developed to study the protein's function.

It has been studied the calcium binding property as well the lipid affinity using Isothermal Calorimetric Titration (ITC). It shows a different mode to bind calcium and phosphoinositides what could imply a difference in the regulation of the synaptic transmission and the processes related to vesicle secretion.

The isolated C2 domains and forming part of the C2AB tandem of rabphilin 3A show differences of affinity for phosphoinositides as well as their affinity for calcium. All this could imply a mode of regulation of the synaptic transmission and the processes of secretion.

C2A domains of tandem C2AB of rabphilin 3A binds to the membranes formed by POPC/POPS/PI(4,5)P₂ mainly through its lysine-rich cluster. The presence of calcium in the media allows the anchoring of the domain to the lipid membrane through the calcium-binding region. The binding areas of the C2B domain remain blocked due to the relative tandem orientation of the two domains in the structure.

The C2AB domain of rabphilin 3A is able to form aggregates in presence of vesicles containing phospholipids allows that the domains of the proteins bind to two membranes in a calcium-dependent manner, hence bringing them together and provoking the enlargement of the size of the aggregate particles. This experimental fact can be observed by analyzing the sample with the Dynamic Light Scattering (DLS) technique. Rabphilin 3A induces membrane curvature in presence of small unilamellar vesicles formed by POPC/POPS/PI(4,5)P₂ in presence of calcium indicating vesicle fusion of small vesicles and this phenomenon was observed with transmission electronic microscopy. The H2 helix becomes the area able to interact with these vesicles.

The generation of mutants constructs have served to determine that the linker among both domains could hamper the aggregation ability, since a mutation, E539A/E540A provoked a significant enhancement of the binding capability. Another checkpoint of the ability to bind to lipid membrane was found in the loops of the calcium binding region, the residue, D429 acting as a positive control of binding of the domain.

English report

The determination of the crystal structure of the C2B domain of rabphilin 3A interacting with SNAP25 has allowed the identification of the key residues involved in this interaction. A combination of several biophysical and biochemical techniques have been used to propose that the tandem C2AB domain are able to coordinate calcium and PI(4,5)P₂ through the calcium-binding region and the lysine rich cluster, while the binding to the SNAP25 takes place through the H2 helix of the C2B domain.

In addition, it has been determined that the interaction observed of the C2AB of rabphilin 3A and SNAP25 also occurs in the complexes SNAP25/STX1A and SNAP25/STX1A/VAMP2.

Rabphilin 3A is a calcium sensor and it is able to bind lipid membrane by different regions as well to interact with SNARE proteins the membrane fusion machinery. This interaction between these proteins serves as an important molecular event in the exocytosis.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
C2-PKC	Dominio C2 de PKC
CBR	Región de unión de calcio
DAG	Diacilglicerol
DAPS	1,2-Acetil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina
DLS	Dispersión dinámica de la luz
DTT	Ditiotreitol
EDC	1-Etil-3(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida
EDTA	Ácido etilenodinitrilotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia
GST	Glutación S-transferasa
H	Coefficiente de Hill
Hepes	N-(2-Hidroxietil)piperacina-N'-(2-ácido etanosulfónico)
H₂O	Agua
IMAC	Cromatografía de Afinidad a metal
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
IP₃	Inositol 1,4,5-trifosfato
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosido
ITC	Calorimetría de titulación isotérmica
Kan	Kanamicina
K_a	Constante de asociación
K_d	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
L	Ligando
LB	Medio Luria-Bertani
LRC	Región de unión a lisinas

LUV	Vesículas unilamelares grandes
M	Macromolécula
MLV	Vesículas multilamelares
n	Número de sitios de unión
NHS	N-Hidroxisuccinimida
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PKD	Proteína quinasa D
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POPC	1-Palmitil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
POPS	1-Palmitil-2-oleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-L-serina
PS	Fosfatidilserina
PSA	Persulfato amónico
PTFE	Membrana Hidrofílica de politetrafluoroetileno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rph3A	Rabfilina 3A
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil-sulfato sódico
SNAP	Proteína Asociada al Sinaptosoma
SOC	Medio de cultivo SOC
SPR	Resonancia de Plasmón de Superficie
STX1A	Sintaxina 1
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas

Abreviaturas

TE	Tampón Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
T_m	Temperatura media de la transición
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
VAMP2	Proteína de Membrana Asociada a Vesículas /Sinaptobrevina
WT	Wild Type (Especie Silvestre)
ΔG	Incremento de la energía libre de Gibbs
ΔH	Incremento de entalpía
ΔH_d	Incremento de entalpía de desnaturalización
ΔS	Incremento de entropía
(p/v)	Relación peso/volumen
(v/v)	Relación volumen/volumen

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

"No hay enigmas, si un problema puede plantearse es que
puede resolverse"

Ludwing Wittgenstein

Introducción y Objetivos

El tráfico de membranas en de las células eucariotas es un proceso vital y altamente regulado que es necesario para el mantenimiento de los distintos compartimentos celulares y el control de la secreción vesicular (*Rothman, 1994; Schekman & Orci, 2016*).

La liberación de neurotransmisores, degranulación de mastocitos y la liberación de hormonas son procesos celulares llevados a cabo por la exocitosis dependiente de calcio (*Südhof, 2013*). Estos procesos de secreción acompañados de la fusión de membranas constituyen uno de los eventos fisiológicos más importantes dentro de la célula. El complejo SNARE constituye el motor principal que lleva a cabo este proceso acercando dos membranas opuestas a través de la formación de un complejo ternario generado por la interacción de SNAP25, STX1A y VAMP2. En el proceso de fusión vesicular participan otras proteínas como Sec1/Munc18 y Munc13. Además de éstas, existen otras proteínas que participan como sensores de calcio, directa o indirectamente. Algunas de estas proteínas tienen un papel directo en la fusión vesicular como es el caso de la sinaptotagmina, mientras que otras proteínas participan en la movilización y preparación de las vesículas en la membrana en un paso previo a la fusión. Estos diferentes sensores podrían actuar en paralelo o de modo secuencial y/o colaborar o competir en este complejo escenario. Entender el comportamiento de estas proteínas es esencial para entender la dinámica de la exocitosis y fusión vesicular. Muchas de estas proteínas tienen dominios C2 como elemento estructural común.

Los dominios C2 fueron identificados inicialmente como el segundo de los dominios conservados en las PKCs (*Coussens et al., 1986; Knopf et al., 1986; Ono et al., 1986*). Comparten un plegamiento general que consiste en una estructura de β -sandwich constituido por 8 cadenas β dispuestas en forma de 2 hojas antiparalelas que están conectadas por una serie de lazos flexibles en la parte superior e inferior del dominio. La mayoría de las proteínas que contienen estos dominios C2 son capaces de unir calcio a través de la región de unión a calcio y fosfolípidos con carga negativa (*Sutton & Sprang, 1998; Verdaguer et al, 1999; Ochoa et al., 2002*). Se ha determinado una región que une de forma específica PI(4,5)P₂ denominada región

rica en lisinas y que está localizada entre las hebras $\beta 3$ y $\beta 4$ del dominio (*Corbalán-García et al., 2003*).

La rabfilina 3A es una proteína que contiene dos dominios C2 dispuestos en tándem conectados a través de un conector. Existen evidencias de la participación de esta proteína en el entramado complejo de la exocitosis y fusión vesicular a través de su capacidad de interactuar con el complejo SNARE (*Josep Rizo et al., 1999; Tsuboi & Fukuda, 2005; Deak et al., 2006*).

A pesar de que los dominios C2 comparten una estructura muy similar, existen diferencias en su afinidad por calcio y fosfolípidos, lo que les confiere a estas proteínas una función característica y específica que les permite actuar en diferentes etapas de la exocitosis y fusión vesicular.

1.-DOMINIOS C2.

Los dominios C2 son considerados como módulos proteicos independientes de plegamiento, solubles en agua que se asocian de manera reversible a las bicapas lipídicas. Están formados por aproximadamente 130 aminoácidos. Estos dominios juegan un papel muy importante en varias funciones incluyendo las interacciones proteína-proteína a través de diferentes regiones de su estructura.

En los últimos años se ha identificado la presencia de este dominio en un número cada vez mayor de proteínas asociadas al tráfico vesicular y la transducción de señales (*Nalefski & Falke, 1996; Cho & Stahelin, 2006; Corbalan-Garcia & Gómez-Fernández, 2014*). Por ejemplo, los dominios C2 se encuentran en otras proteínas como la sinaptotagmina, una proteína integral de membrana sensible al calcio que está localizada en las vesículas sinápticas (*Perin et al., 1990*). Otras proteínas en las que se han identificado los dominios C2 fue en el extremo amino terminal de la fosfolipasa A₂ citosólica dependiente de calcio (PLA_{2c}) (*Clark et al., 1991*), la proteína Ras-GAP, en todas las isoenzimas de fosfolipasas C específicas de fosfoinosítidos (PLC) (*Trahey et al., 1988; Kriz et al., 1990*), en la proteína DOC2 presente en las vesículas sinápticas (*Orita et al., 1995*), Munc 13 y RIM (*Brose, Hofmann, Hata, & Südhof, 1995; Y Wang, Okamoto, Schmitz, Hofmann, & Südhof, 1997*), estas últimas implicadas en la transmisión sináptica. También se ha determinado la presencia de estos dominios en la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), esta proteína está implicada en la fosforilación de varios fosfoinosítidos (*Stephens, Jackson, & Hawkins, 1993*). De igual modo se ha identificado la presencia de este tipo de dominios en la proteína rabfilina 3A; esta proteína interacciona con la GTPasa Rab3A y se encuentra en las vesículas sinápticas y gránulos de secreción (*Shirataki et al., 1993; McKiernan, Stabila, & Macara, 1996*). En las isoenzimas nuevas de la PKC (ϵ , η , δ , θ) aparecen estos dominios en el extremo amino terminal, funcionando de forma independiente de Ca²⁺, demostrando así que no todas las proteínas que contenían dominios C2 estaban reguladas por calcio.

Los dominios C2 descritos hasta la fecha se almacenan en bases de datos como SCOP (*Structural Classification of Proteins*) que clasifica los dominios C2

dentro de la superfamilia de unión a calcio/lípidos (<http://www.scop.mrc-Imb.cam.ac.uk/scop/>). Otro sistema de clasificación es CATH (*ClassArchitectureTopologyMology*) que recoge alrededor de 53 millones de dominios proteicos clasificados en 2737 superfamilias (<http://www.cathdb.info/>). Los distintos dominios C2 se definen 5 estructuras "todo beta" que pertenecen a la superfamilia C2 de unión a calcio/lípidos (*Sillitoe et al., 2013; Corbalan-Garcia & Gómez-Fernández, 2014*). La base de datos PFAM (*Protein Families*) (<http://www.pfam.xfam.org/>) está basada en la predicción de estructuras y de la generación de patrones filogenéticos. Estos resultados revelaron la existencia de un antecesor eucariota común que presentaba al menos 10 dominios distribuidos en 6 familias (*Zhang & Aravind, 2010*).

Muchos de los estudios que hay en la literatura de proteínas que contienen estos dominios están relacionados con defectos tales como, cáncer, desórdenes neurológicos y distrofia muscular entre otros.

1.1-Estructura.

Varias estructuras de dominios C2 han sido determinadas mediante cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) (*Corbalan-Garcia & Gómez-Fernández, 2014*). Todos estos dominios comparten una estructura común conocida como sandwich β compacto, que presenta ocho cadenas β -antiparalelas, agrupadas en dos hojas de cuatro cadenas cada una conectadas mediante lazos flexibles en la parte superior e inferior de la estructura (*Shao et al., 1996; Sutton & Sprang, 1998; J Rizo & Südhof, 1998; Verdaguer et al., 1999; Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006*). En algunas de estas proteínas con dominios C2 en los lazos aparecen inserciones en forma de α -hélices como en el caso del dominio C2B de sinaptotagmina 1 y de rabfilina 3A. Las interacciones intermoleculares de los dominios C2 han sido observadas en los lazos donde se encuentra la capacidad exclusiva de unir Ca^{2+} (*Shao et al., 1996; J Rizo & Südhof, 1998; Sutton & Sprang, 1998; Guillen et al., 2013*). La segunda región funcional de los dominios C2 es la región polibásica o región rica en lisinas (*Ochoa et al., 2002*) localizada entre las

Introducción y Objetivos

hebras β_3 y β_4 . La mayor variabilidad en la estructura de estos dominios se localiza en la región amino-terminal y en las conexiones entre las cadenas.

La secuencia de los dominios C2 está muy conservada en las cadenas β , sin embargo, en las regiones de conexión entre estas cadenas existe una gran variabilidad en la secuencia, y además encontramos residuos de prolina e histidina, lo que posibilita la formación de giros en estas zonas. Es por este motivo por el que a las cadenas β se les ha atribuido una función meramente estructural, mientras que la especificidad del dominio parece residir en los bucles de conexión entre las cadenas (*Eric A. Nalefski & Falke, 1996*).

Según este criterio, los dominios C2 de mamíferos pueden ser clasificados en dos grupos en función de la capacidad de unir Ca^{2+} y de su topología (*Pappa et al., 1998; Sutton & Sprang, 1998; Verdaguer et al., 1999; Ochoa et al., 2001*).

-Tipo I o familia-S, incluye a los dominios C2 de las PKCs convencionales.

-Tipo II o familia-P, incluye a los dominios C2 de las PKCs nuevas.

La principal diferencia entre ambas topologías es que la primera cadena en los dominios C2 de topología I ocupa la posición estructural de la cadena 8 de los dominios C2 de topología II. Los dominios C2 de topología II presentan una permutación respecto a los de topología I. Ambas topologías son interconvertibles, tal es así, que para pasar de la topología I a la II es suficiente la fusión de los extremos amino y carboxilo terminal y la reaparición de dichos extremos por ruptura del enlace entre las cadenas β_1 y β_2 (*Eric A. Nalefski & Falke, 1996*).

No se conocen exactamente las diferencias que implican la aparición del dominio C2 en una u otra topología, pero se ha especulado que las diferentes topologías podrían estar influenciando la orientación relativa de los dominios C2 respecto a sus dominios vecinos (*Josep Rizo & Südhof, 1998*).

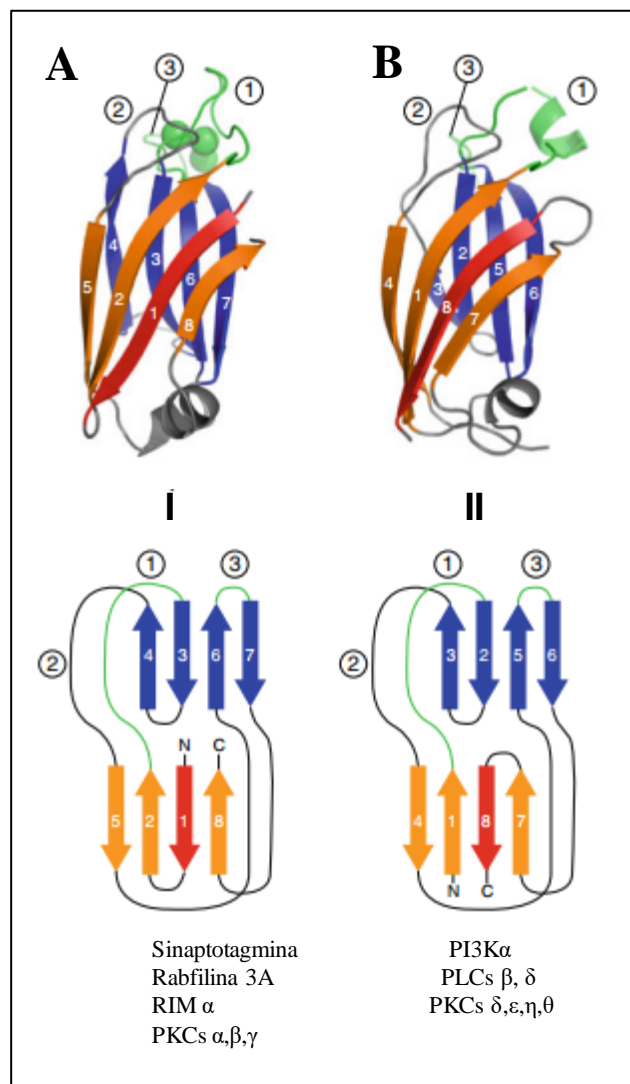


Figura I.1.- Diagrama de las topologías I, A) y topología II, B). Las hebras β se representan en color naranja y azul. La primera cadena de la topología I ocupa la misma posición estructural que la octava cadena de la topología II y aparece coloreada en rojo, lo que provoca el desplazamiento del orden de las cadenas homólogas en la estructura primaria. La región de unión a calcio aparece en color verde y los números en los círculos se corresponden con los lazos de la CBR. Ambas topologías son fácilmente interconvertibles, la topología I pasa a ser topología II cuando sus extremos amino y carboxilo terminal se fusionan y generan nuevos extremos terminales cortando el bucle entre las cadenas $\beta 1$ y $\beta 2$.

1.2.- Sitio de unión de Ca²⁺ en los dominios C2.

El ion Ca²⁺ es un segundo mensajero ubicuo y esencial que controla diversos procesos celulares como la diferenciación y proliferación celular, la contracción muscular y apoptosis entre otras (*Berridge, Bootman, & Roderick, 2003*).

Estudios pioneros de dominios C2 con los dominios C2A de sinaptotagmina 1, PLC δ 1, PKC β y α y cPLA demostraron que la región de unión a Ca²⁺ estaba formada por tres bucles (CBR1-3) localizados en la parte superior del dominio y que proporcionaban todos los residuos que participaban en la coordinación con este ion. Se ha determinado que en los dominios C2 que unen calcio esta región está formada por un bucle que se corresponde con la conexión entre las cadenas β 2 y β 3. Se trata de una región bien conservada entre las PKC clásicas pero muestra diferencias significativas con las PKC nuevas, por ejemplo las PKC ϵ y η , poseen un bucle más largo para unir a las cadenas β 1 y β 2 (*Pappa et al., 1998; Ochoa et al., 2001*). En el caso de las PKC clásicas la unión del calcio a los dominios C2 es posible gracias a la presencia de 5 residuos de ácido aspártico. Tres de estos residuos (Asp187, Asp246 y Asp 248) coordinan de manera simultánea los iones Ca²⁺ de los sitios Ca1 y Ca2, mientras que el Asp246 se une a los dos iones Ca²⁺ a partir de los oxígenos del grupo carboxilo, mientras que los residuos de las posiciones 187 y 248 establecen interacciones bidentadas con los Ca1 y Ca2, respectivamente y a su vez, tienen otras uniones de coordinación con el Ca1, en el caso del Asp248 y con el Ca2 en el caso del Asp187. Los dos residuos de ácido aspártico que quedan, Asp193 y Asp254 coordinan los iones Ca²⁺ con un oxígeno, Ca1 es coordinado por Asp193 y Ca2 por el Asp254. Los átomos de O₂ de la cadena principal de los residuos de Met186 y Trp247 de PKC α participan en la coordinación del calcio en los sitios Ca2 y Ca1 respectivamente. El calcio en la posición Ca3 está coordinado por los residuos de la región CBR3, Thr251 y Arg252 (*Corbalán-García&Gómez-Fernández, 2006*) (Figura I.2).

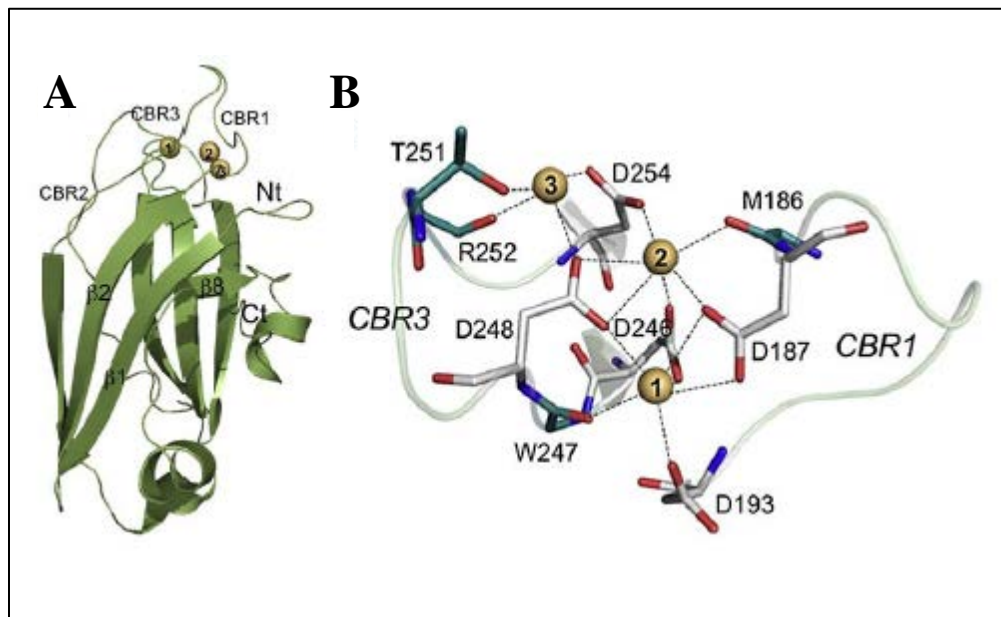


Figura I.2: Anatomía molecular del sitio de unión a calcio en PKC α . A) Estructura del dominio C2 de la PKC α . Obsérvese los bucles CBR1, CBR2 y CBR3, regiones que interaccionan con los átomos de calcio (esferas amarillas) numerados de 1 a 3 en función de la posición que ocupan. B) Residuos clave para la coordinación del Ca $^{2+}$. Imagen tomada de Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2014.

Por otro lado, mediante estudios de RMN, se ha determinado que el Ca $^{2+}$ se coordina con el dominio C2A de sinaptotagmina 1 a través de los residuos Asp172, Asp178, Asp230, Asp232, S235 y Asp238, siendo la orientación del residuo de Asp178 crítico para poder coordinarse con el calcio. Este dominio es capaz de unir tres iones Ca $^{2+}$, mientras que el dominio C2B de sinaptotagmina1 une dos iones Ca $^{2+}$ que son coordinados por residuos Asp303, Asp309, Asp363, Asp365 y Asp371, donde la ausencia del grupo hidroxilo de la serina sería la responsable de la débil interacción con un tercer ion Ca $^{2+}$ (Fernández-Chacón *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2008; Anand Radhakrishnan *et al.*, 2009).

La superposición del dominio C2 de la PKC α con el de la PKC β y el dominio C2 de sinaptotagmina mostraron la elevada homología que guardan entre sí. Todos estos dominios unen de 2 a 3 iones Ca $^{2+}$ y conservan los residuos implicados en la coordinación con Ca $^{2+}$ (Sutton *et al.*, 1995; Xuguang Shao *et al.*, 1996; Verdaguer *et al.*, 1999) (Figura I.3).

Introducción y Objetivos

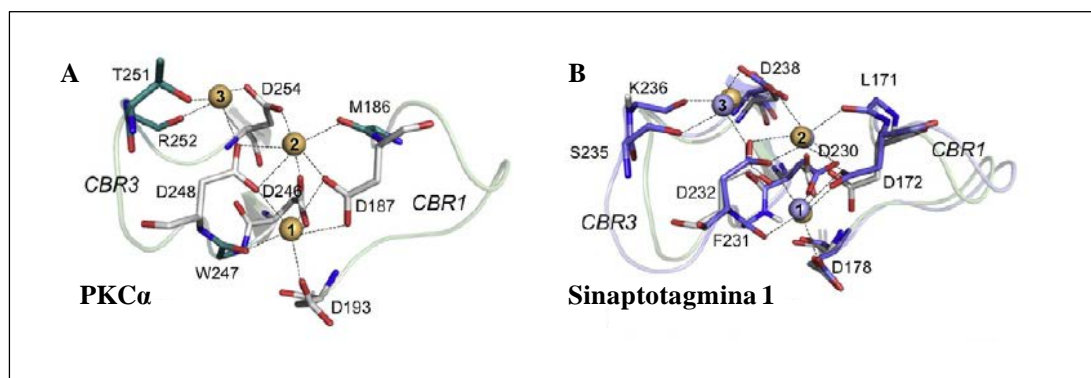


Figura I.3: Comparación del modo de unión de calcio a la PKC α (PDB: 3GPE) y Sinaptotamina (PDB:1BYN). A) PKC α coordina los iones calcio (representados como esferas amarillas numeradas de 1-3) a través de los residuos de ácido aspártico (aparecen en la imagen en forma de varillas). B) Superposición de PKC α (gris) y sinaptotagmina 1 (violeta). Imagen tomada de *Corbalán-García & Gómez-Fernández 2014*.

Existen dominios C2 que presentan un modelo de coordinación distinto, como es el caso de la PLC δ . Esta estructura es capaz de interactuar con dos átomos de Ca $^{2+}$, uno de los cuales ocupa el sitio del calcio 1 (Ca1), mientras que el segundo ocupa un lugar alternativo definido como sitio del calcio 4 (Ca4). Para la coordinación de este átomo de calcio es necesaria la participación del Asp677 localizado en el CBR2. La resolución de la estructura de la cPLA reveló un modelo de coordinación similar al de la PLC δ , salvo que en lugar de un residuo de ácido aspártico había un residuo de Asn95 que impedía la unión al tercer átomo de calcio (Figura I.4).

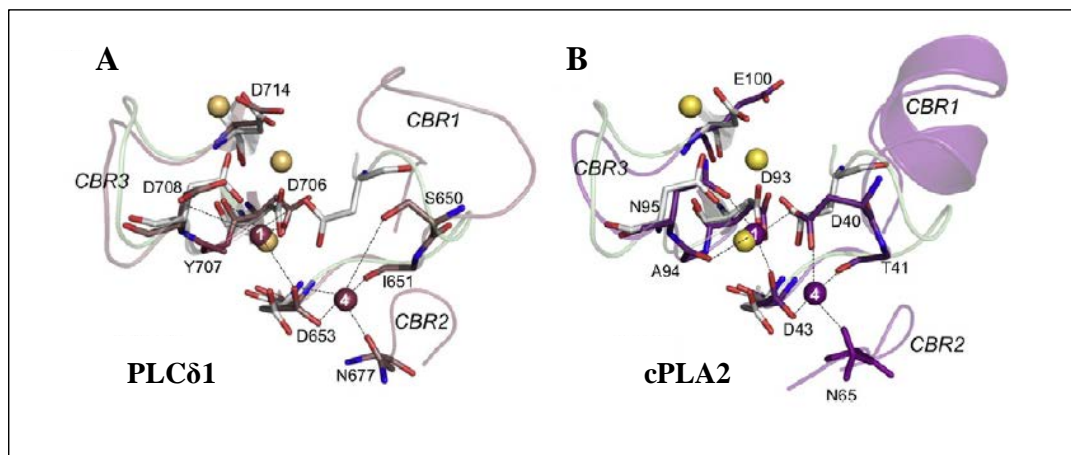


Figura I.4: Superposición de la estructura de la PKC α (PDB: 3GPE) con PLC δ (PDB: 1DJJ) y cPLA2 (PDB: 1RLW). Los iones de calcio aparecen representados como esferas de color amarillo y los residuos de aspartico que coordinan al calcio en forma de varilla. Imagen tomada de *Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2014*.

El resultado observado de la comparación de estas estructuras en sus formas libre y con calcio unido, fue que no se producían grandes cambios conformacionales cuando se unía este ion (*Shao et al., 1996; Shao et al., 1998; Verdaguer et al., 1999*). Con estos datos resulta difícil explicar cómo el Ca^{2+} es capaz de regular la función de los dominios C2 sin generar cambios conformacionales en la estructura. Por un lado hay indicaciones que demuestran que la unión del Ca^{2+} a los dominios C2 es capaz de provocar cambios en el potencial electrostático de la región de unión a calcio y ello sería clave para regular las interacciones con la membrana y otras proteínas (*Murray & Honig, 2002; X Shao et al., 1997*). En el caso del dominio C2A de sinaptotagmina1, la unión de calcio provoca un cambio en el potencial electrostático de la zona, de negativo, por la presencia de residuos de ácido aspártico, a positivo, lo cual junto a los residuos con carga positiva que hay alrededor de la zona favorecen la interacción entre la sinaptotagmina1 y otras estructuras que presentan carga negativa. De hecho el estudio de la interacción del dominio C2A de sinaptotagmina1 dependiente de calcio con syntaxina1 mostró que dicha interacción estaba mediada por la región de unión del calcio del dominio C2A y que provocaba un cambio en el potencial electrostático inducido por calcio (*Shao et al., 1998*).

Se han encontrado dos excepciones para los dominios C2A de la proteína piccolo y rabfilina 3A, donde se ha visto que la unión de calcio induce un cambio

Introducción y Objetivos

conformacional significativo. En el dominio C2A de piccolo la separación entre el CBR1 y CBR3 es más amplia que en el resto de los dominios C2 mientras que es más limitada para el caso de rabfilina 3A (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2014) (Figura I.5).

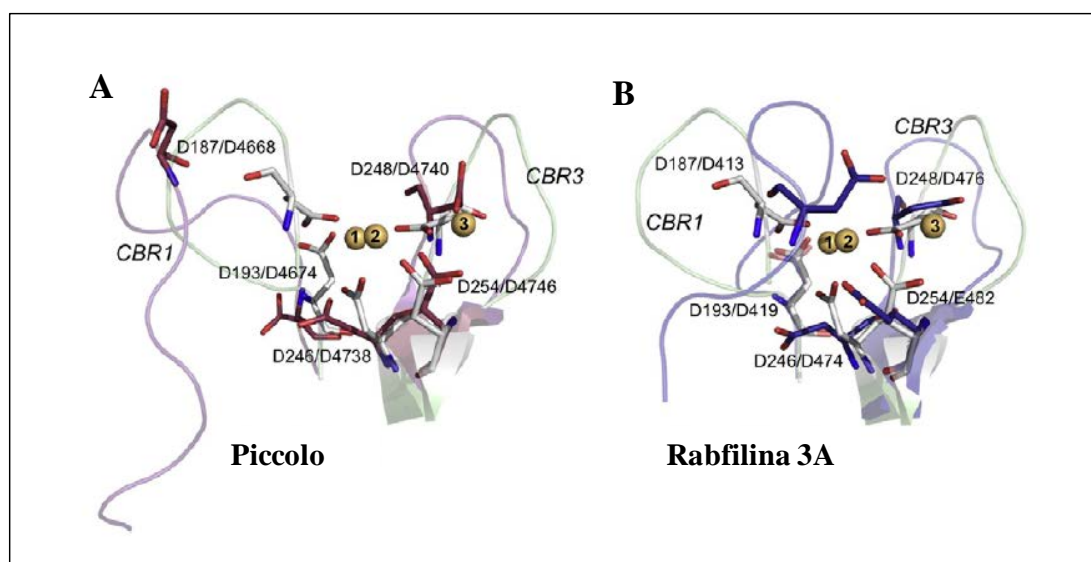


Figura I.5: Superposición de la PKC α (gris) con la A) proteína piccolo (PDB: 1RH8) en violeta y con B) rabfilina 3A (PDB: 2CHD). Los iones calcio que se coordinan con los residuos de ácido aspártico de PKC α aparecen en forma de esferas amarillas. Las proteínas piccolo y rabfilina 3A no aparecen coordinadas con calcio, los residuos de ácido aspártico están dispuestos en una conformación incompatible con la coordinación con el calcio en ambos casos. Imagen tomada de Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2014.

La obtención de la estructura del dominio C2 de la PKC α junto con calcio y 1,2-dicaproil-*sn*-glicerofosfoserina (DCPS), un fosfolípido soluble permitió deducir dos hechos fundamentales (Verdaguer *et al.*, 1999; Ochoa *et al.*, 2002). El primero de ellos fue que la interacción con fosfolípidos completa la esfera de coordinación del calcio y como consecuencia este ion actúa como un puente mediando la interacción del dominio con la membrana. Por otro lado también se observó como varios residuos en el CBR eran capaces de interactuar de manera específica con el fosfolípido (Figura I.6).

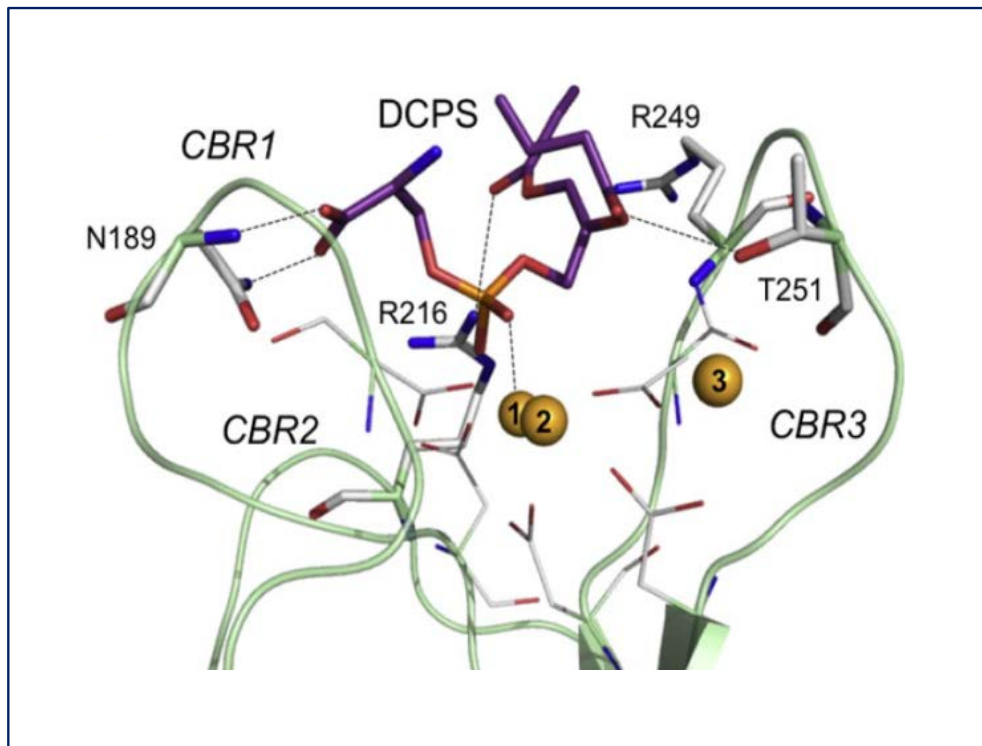


Figura I.6: Estructura del dominio C2 de PKC α unido a DCPS. Los átomos de calcio (amarillo) y la DCPS (naranja) interactúan con la PKC α (verde). Imagen tomada de Corbalán-García & Gómez-Fernández 2014.

En el caso del dominio C2 de PLC δ 1 no se conservan las dos argininas claves (Arg216 y Arg249) para la interacción con DCPS sin embargo, su alto potencial electropositivo permite que interactúe con fosfatidilserina (Lomasney *et al.*, 1999). Para el caso de la cPLA₂ el CBR1 es más largo que en otras proteínas con estas características, apareciendo en esta región una α -hélice adicional. Esta proteína interactúa con fosfolípidos neutros como la fosfatidilcolina, sin embargo no conserva ninguno de los residuos implicados en la unión con DCPS. En su superficie aparecen residuos hidrofóbicos, y aún cuando un calcio continúa ese carácter hidrofóbico lo que permite al dominio interactuar con las membranas (Perisic *et al.*, 1998; Frazier *et al.*, 2002).

Estos estudios demuestran que los dominios C2 son capaces de interactuar con la membrana mediante residuos localizados en la parte superior del dominio y su variabilidad le permite determinar su localización subcelular, el grado de penetración

Introducción y Objetivos

y la orientación del dominio modulando la actividad de la proteína (*Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014*).

La capacidad de unión y diferente afinidad por calcio modulada por la presencia de fosfolípidos de estas proteínas que contienen dominios C2 permitiría que cada una de ellas participara en los distintos eventos de exocitosis o endocitosis de forma aislada o coordinada (*Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014*).

La capacidad de unión del Ca^{2+} a rabfilina 3A ha sido estudiada desde resonancia magnética nuclear (RMN) hasta el análisis de estructuras cristalinas. Mediante trabajos previos con la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se determinó que el dominio C2B de rabfilina 3A era capaz de unir 2 iones calcio con baja afinidad (*Ubach et al., 1999*). En 2006 el grupo de Stefan Becker determinó la estructura cristalina del dominio C2A de rabfilina 3A corroborando que se trataba de un dominio similar al encontrado en la PKC α y sinaptotagmina. En esta estructura se determinó que todos los residuos ácidos que participaban en la unión con calcio estaban repartidos en los tres CBR (*Biadene et al., 2006*). La superposición de esta estructura con las estructuras de los dominios de C2A de sinaptotagmina 1 (*Sutton et al. 1995*), sinaptotagmina 3 (*Sutton et al., 1999*), proteína quinasa C β (*Sutton & Sprang 1998*), y proteína quinasa C α (*Verdaguer et al. 1999*) mostraron una elevada homología entre ellas resultando la principal diferencia la observada entre los CBR1 y CBR3. Ensayos posteriores consiguieron resolver la estructura del dominio C2A en su forma unida a Ca^{2+} por RMN revelando nuevos datos sobre las propiedades de unión del IP₃. La unión de Ca^{2+} e IP₃ en el dominio era cooperativa, de modo que la unión inicial de Ca^{2+} aumentaba la afinidad por el IP₃ y esto a su vez proporcionaba una mayor avidez por Ca^{2+} . Esta cooperatividad se explicaría por la unión inicial del ion, éste generaría un desplazamiento lateral del CBR3 quedando los residuos básicos de este lazo cercanos a la región polibásica situada entre las hebras β 3 y β 4 del dominio favoreciendo así su unión a PI₃. Estos cambios conformacionales podrían estar asociados a una elevada energía de activación que explicaría la baja afinidad del dominio por Ca^{2+} y la cooperatividad entre los dos sitios de unión a Ca^{2+} .

En nuestro grupo de investigación se obtuvo la estructura del dominio C2A de rabfilina 3A unida a Ca^{2+} , lo que permitió proponer el mecanismo por el cual el ion calcio es capaz de interactuar con el dominio (Guillen *et al.*, 2013). Si se comparaba la estructura del dominio con Ca^{2+} y sin Ca^{2+} , en esta última situación se observaba un espacio muy estrecho entre el CBR1 y CBR3 lo que impedía el acceso del calcio por la parte superior del dominio; este estado representaría una "conformación cerrada" y el único modo por el que el ion podría acceder al dominio sería a través de las cavidades situadas en los laterales del CBR. Estos resultados sugieren que el primer ion calcio entraría en la estructura a través de la cavidad derecha donde se encuentran los residuos de Asp413, Asp476 y Glu482, tratándose, por tanto de una zona electronegativa. El calcio se colocaría en una zona próxima a la posición 2, Ca2, y sería entonces cuando se produciría un cambio conformacional que permitiría la entrada de un segundo ion calcio que se posicionaría en Ca1. La reorganización estructural observada tendría lugar cuando el dominio C2A coordina los dos iones calcio. El dominio C2A estaría en la "conformación abierta" (Figura I.7 y I.8) (Guillen *et al.*, 2013).

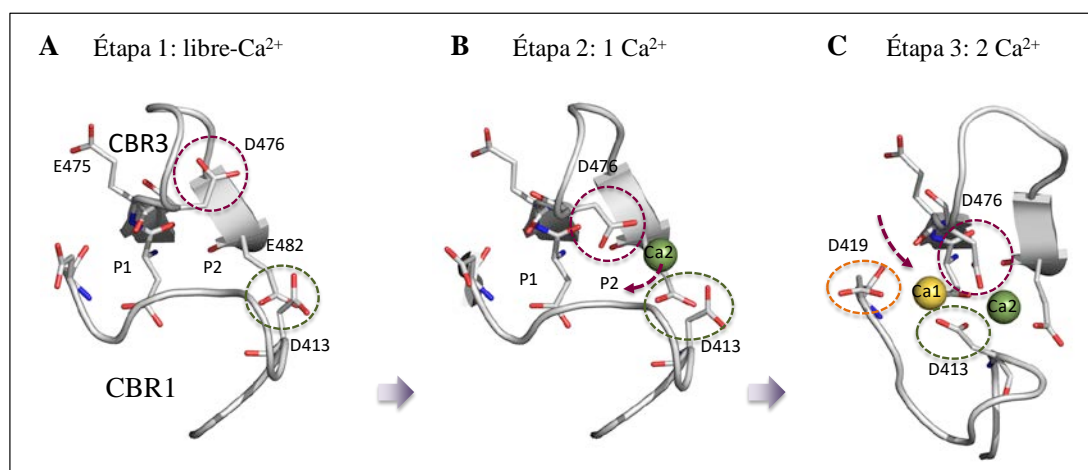


Figura I.7: Proceso de unión del calcio a la rabfilina 3A. (A) Se muestra el dominio sin calcio. Los residuos clave aparecen representados en modelo de varillas, así como el sitio lateral de entrada del primer átomo de calcio. (B) Llegada del primer átomo de calcio. (C) Estructura abierta tras la unión de los dos iones calcio. Se observa una reorganización en el sitio de unión a calcio. Imagen tomada de Guillen *et al.*, 2013.

Introducción y Objetivos

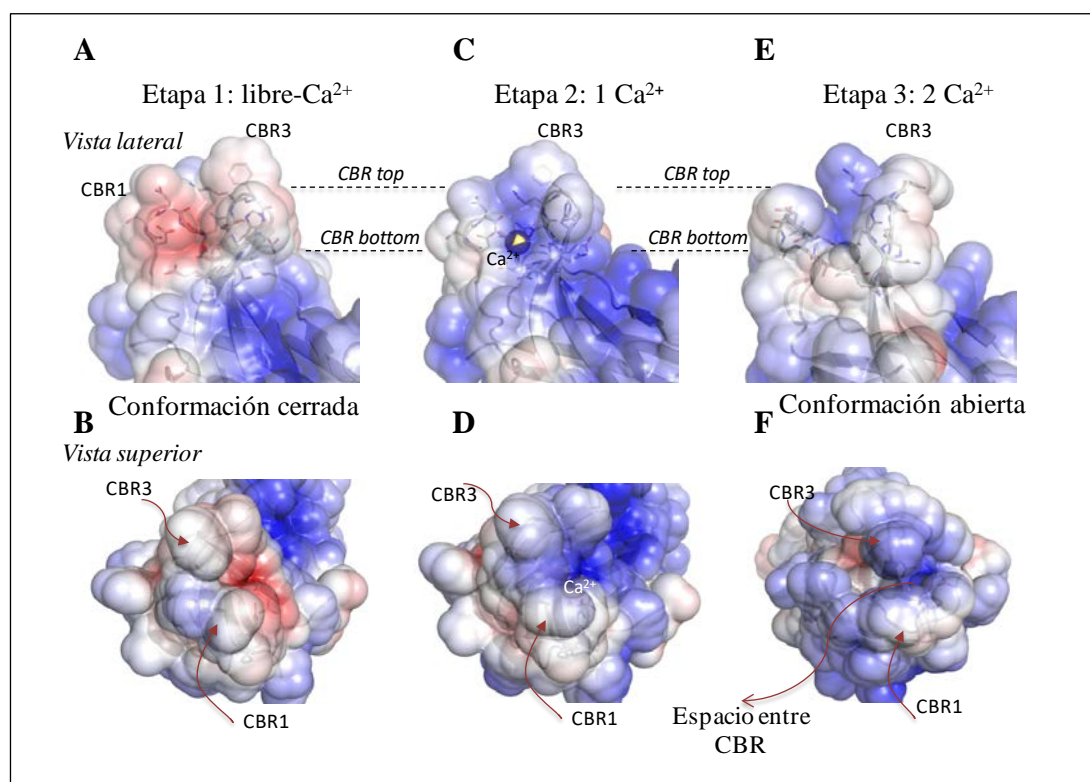


Figura I.8: Representación electrostática del dominio C2A de rabfilina 3A en los diferentes estados de unión de calcio. La parte superior de la imagen muestra los potenciales electrostáticos calculados en ausencia de calcio (D), presencia de un ion calcio (E) y dos iones calcio (F). La imagen del dominio C2A de rabfilina 3A en ausencia de calcio es tomada de PDB 2CHD, mientras que la estructura usada para identificar los cambios observados con la entrada de 1 y 2 iones calcio corresponde a la estructura descrita en el trabajo (Guillén *et al.*, 2013) cuya entrada en PDB es 2K3H.

El grupo de Ubach (Ubach *et al.*, en 1999) tomó como ejemplo el C2B de rabfilina 3A para estudiar la estructura 3D y sus propiedades intrínsecas de unión a calcio mediante RMN. El dominio C2B une dos iones calcio con una afinidad mayor a como lo hace el dominio C2A de sinaptotagmina 1 teniendo una estructura similar entre ellas. El dominio C2B mostraba una estructura típica de los dominios C2 descritos hasta entonces, pero además presentaba una α -hélice (hélice H2) que no aparece en el dominio C2A de sinaptotagmina 1 y que es más larga que la hélice H1 (que sólo tiene 4 residuos) localizada también en el mismo dominio, y que está orientada de manera paralela a las hebras β , su secuencia se encuentra entre las hebras $\beta 7$ y $\beta 8$. Esta hélice también aparece en otros dominios C2 como es el caso de PKC- δ , aunque en este caso es más corta (7 residuos) y no está igualmente dispuesta

en la estructura. Las propiedades Ca^{2+} dependiente e independiente se debe por tanto a la unión de los 2 iones Ca^{2+} por la zona de los CBRs al igual que los demás dominios C2 descritos. Por otro lado la α -hélice localizada en la parte inferior del dominio podría estar implicada en la interacción Ca^{2+} independiente del dominio con otras proteínas (*Ubach et al., 1999*).

1.3-Sitios de unión a lípidos.

La mayoría de los dominios C2 incluyendo sinaptotagmina, $\text{PKC}\beta$, $\text{PLC}\delta$, cPLA2, etc., son capaces de unir fosfolípidos de manera calcio-dependiente. Esta característica es distintiva de estos dominios C2 y es la única actividad de estos que se ha demostrado de manera inequívoca que es funcionalmente relevante. Las preferencias por los fosfolípidos depende de las proteínas, así mientras que los dominios C2 de sinaptotagmina y $\text{PKC}\beta$ unen fosfolípidos con carga negativa, el dominio C2 de cPLA2 une preferentemente fosfolípidos neutros (*Johnson, Edwards, & Newton, 1997; X Shao et al., 1997; Nalefski & Falke, 1998; J Ubach, Zhang, Shao, Südhof, & Rizo, 1998*). La unión de lípidos de manera calcio-dependiente ocurre con una elevada cooperatividad y una constante de afinidad mayor que la unión de calcio a los dominios C2. Esto es probablemente debido a que es necesario que todos los sitios de unión al calcio estén ocupados y ello se consigue porque la cabeza de los fosfolípidos es capaz de completar la esfera de coordinación de los iones calcio (*Ubach et al., 1998; Verdaguer et al., 1999*). En contraste la unión de fosfolípidos en el caso de los dominios C2 de PI3K y la proteína supresora de tumores PTEN muestra la unión a fosfolípidos de manera constitutiva de modo calcio independiente.

La falta de un cambio conformacional en los dominios C2 cuando unen calcio implica que la interacción con fosfolípidos no provoca la apertura de la cavidad hidrofóbica sino una interacción entre la proteína de la superficie y los lípidos.

La determinación de la estructura 3D del dominio C2 de $\text{PKC}\alpha$ unido a calcio y a un fosfolípido soluble, 1,2-dicaproyl-*sn*-glicerofosfoserina (DCPS) (*Verdaguer et al., 1999*) permitió dilucidar que la interacción con fosfolípidos completaba la coordinación de los iones calcio en la región de unión al calcio, de modo que el

Introducción y Objetivos

calcio actuaba como puente, mediando la interacción del dominio C2 con la membrana y que varios residuos son capaces de interactuar de manera específica con el fosfolípido.

En 2002 se obtuvo la estructura cristalina del dominio C2 de la PKC α con calcio y un fosfolípido aniónico el 1,2-diacetil-*sn*-glicerofosfoserina (DAPS). En esta estructura el fosfolípido era capaz de interactuar en una región diferente a las observadas en estructuras anteriores. Esta región estaba alejada de la zona de unión a calcio y se caracterizaba por presentar una superficie con un elevado potencial electropositivo formado por cuatro residuos de lisina, por lo que se lo denominó dominio rico en lisinas (*Ochoa et al., 2002*).

En 2003 se determinó que el dominio C2 de la PKC α era capaz de interactuar con fosfatidilinositol-4,5 bisfosfato (PI(4,5)P₂) con una especificidad mayor frente a los demás fosfolípidos aniónicos (*Corbalán-García et al., 2003*). Esta interacción permitía la activación del enzima lo que suponía un mecanismo nuevo diferente al descrito clásicamente adquiriendo el PI(4,5)P₂ un papel fundamental no descrito hasta entonces.

La obtención de dos estructuras cristalinas, dominio C2 de la PKC α unido a Ca²⁺ y PI(4,5)P₂ y la estructura del dominio C2 unido a Ca²⁺, POPS y PI(4,5)P₂ (*Guerrero-Valero et al., 2009*) permitió identificar al sitio rico en lisinas en las hebras β 3 y β 4, donde la cabeza del fosfolípido se localiza en esta cavidad y los tres fosfatos del fosfolípido y el polialcohol interactúan directamente con el dominio C2. Se produce una interacción electrostática entre el residuo de Lys197 con el fosfato 5 y el grupo hidroxilo en posición O6 del anillo del inositol. La Lys209 interactúa con el fosfato 1, mientras que la Lys211 lo hace con el fosfato 4. Además de estos residuos otros tres aminoácidos contribuyen a la interacción del fosfolípido. La Tyr195 establece un puente de hidrógeno con los fosfatos 4 y 5 y la cadena lateral de la Asn253 establece un puente de hidrógeno con el grupo fosfato 5, el Trp245 también es capaz de interactuar con el fosfato 5 (*Guerrero-Valero et al., 2009*).

Estos estudios revelaron la existencia de un mecanismo inesperado de interacción con la membrana plasmática a través de residuos aromáticos y catiónicos que permitían la unión con el PI(4,5)P₂. Con estos datos se demostró que al menos el dominio C2 de la PKCα era capaz de interactuar con POPS y PI(4,5)P₂ a través de dos dominios diferentes, siendo esencial para desempeñar su correcta función (Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006; Guerrero-Valero et al., 2009).

En base a estos resultados surge la pregunta de si estos residuos responsables de la interacción descritos en la PKCα aparecían conservados en otros dominios C2. Para ello se realizaron estudios de alineamiento de secuencias usando VAST-MMBD, NCBI Structure Group (Gibrat, Madej, & Bryant, 1996; Yanli Wang et al., 2007). Se determinó que la Tyr195 de la PKCα estaba bien conservada en todos ellos, la Lys197 aparecía conservada sólo en los dominios C2 de topología I con excepción del dominio C2A de sinaptotagmina VIII. Lys209 y Lys211, localizadas en la hebra β4 aparecían conservadas principalmente en los dominios con topología I a excepción del dominio C2A de sinaptotagmina y el dominio C2 de DOC2γ. El residuo de Asn253 estaba conservado en los dominios de topología I. Finalmente el residuo de Trp245 aparece conservado en la mayoría de los dominios C2 de topología I o es sustituido por residuos hidrofóbicos tales como Leu, Val o Tyr. Por el contrario, los dominios C2 de topología II no conservaban la mayoría de estos residuos responsables de la interacción con PI(4,5)P₂ (Figura I.9).

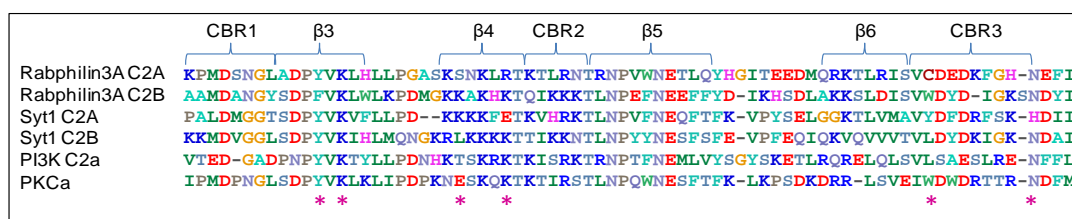


Figura I.9: Alineamiento de secuencias de diferentes dominios C2 de topología I. Las estrellas muestran los residuos conservados que interactúan de forma específica con el PI(4,5)P₂: residuo de Tyr y Lys en la hebra β3, dos residuos de Lys en β4 y un residuo de Asn en la hebra β6, siendo más variables los residuos localizados al final de la hebra β6.

Introducción y Objetivos

Estos resultados permitieron crear una secuencia consenso que sugería que residuos de la estructura primaria de estos dominios interaccionarían de forma potencial con el PI(4,5)P₂.

Tyr X₃ Lys X₉ LysX Lys X₃₃ Trp (Tyr/Leu/Cys) X₇ Asn

Donde X₉ representaba el lazo que conectaba las hebras β₃ y β₄ y X₃₃ correspondía con el segmento que incluía β₅, β₆ y la zona que conectaba los lazos, lo cual podría implicar que el número de residuos de aminoácidos podía variar en cada caso particular de dominio C2.

Además de los dominios C2 de las PKCs clásicas se han descrito otros dominios C2 capaces de unir PI(4,5)P₂, como el dominio C2A de sinaptotagmina III y VIII (Bai, *et al.*, 2004), dominio C2B de sinaptotagmina I, VII y IX (Schiavo *et al.*, 1996; Jihong Bai *et al.*, 2004) o los dominios C2A y C2B de rabfilina 3A (Chung *et al.*, 1998; Coudevylle *et al.*, 2008). Al estudiar el alineamiento observamos que Tyr195, Lys195 y Lys209 estaban conservados en todos ellos, la Lys211 también aparecía conservada a excepción del dominio C2A de sinaptotagmina.

Recientemente, nuestro grupo de investigación en colaboración con el IBMB-CSIC de Barcelona obtuvo la estructura cristalina del dominio C2A de rabfilina 3A con PI(4,5)P₂ y Ca²⁺ y a IP₃ y Ca²⁺. Estas estructuras mostraron un modo de interacción similar al observado en la estructura 3D del dominio C2 de la PKCα. La Lys423 localizada en la hebra β₃ formaba un enlace con el fosfato 4, Lys435 de la hebra β₄ establecía un enlace de hidrógeno con el grupo hidroxilo O3 del anillo del inositol y la Arg437 localizada también en la hebra β₄ interaccionaba con el grupo fosfato del PI(4,5)P₂. Además, la Arg437 estaba implicada en la interacción con Glu475 en ausencia de Ca²⁺ lo que sugería que este residuo tenía un papel principal en la activación de rabfilina 3A por Ca²⁺ y PI(4,5)P₂. Los grupos fosfato 4 y 5 del PI(4,5)P₂ establecían enlaces por puente de hidrógeno con Tyr421, localizada en la hebra β₃ y Asn481 localizada en la región de unión a calcio 3 (CBR3). Finalmente el grupo fosfato5 establecía un enlace salino adicional con la cadena lateral de Lys410. Los datos cristalográficos sugieren que el dominio C2A de rabfilina podría

interaccionar con PI(4,5)P₂ de manera independiente de Ca²⁺ (Figura I.10) (Guillén *et al.*, 2013).

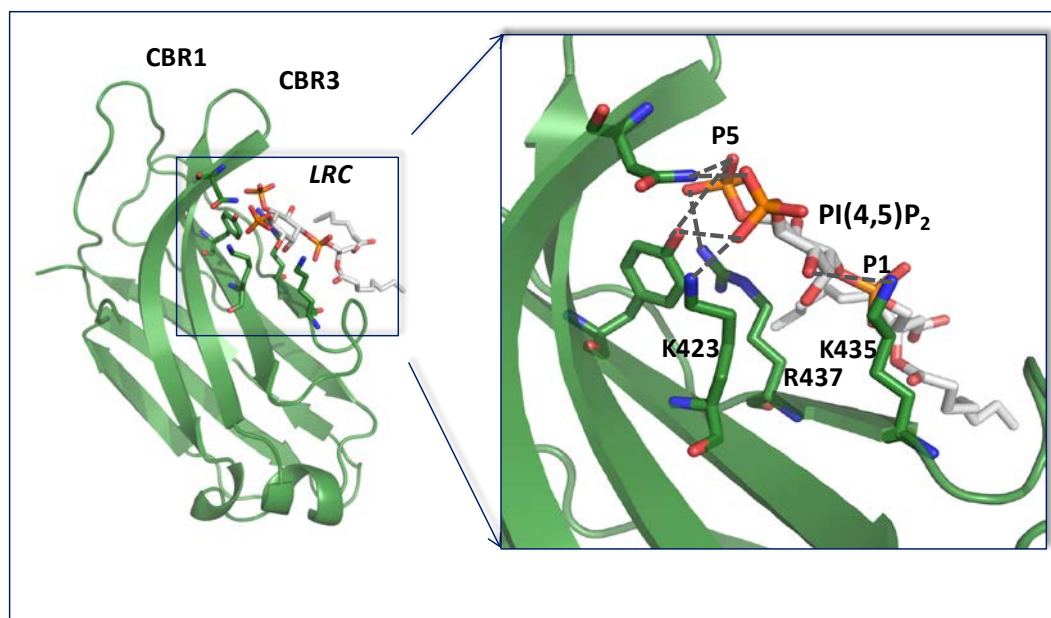


Figura I.10: Estructura del dominio C2A de rabfilina 3A unido a PI(4,5)P₂. La molécula de C2A se muestra en verde y se detallan como varillas las cadenas laterales de los aminoácidos de las hebras β 3 y β 4 que interaccionan con la molécula de PI(4,5)P₂. A la derecha se observa en detalle las interacciones entre el dominio C2A de rabfilina 3A y el PI(4,5)P₂. En línea punteada de color gris se marcan los enlaces de hidrógeno.

1.4.- Influencia de la orientación de los dominios C2 cuando forman el tándem C2AB.

El número de dominios C2 que pueden aparecer en este tipo de proteínas varía desde 2 hasta 5 ó 7 como en el caso de las proteínas tipo Ferlins. Estos dominios están conectados a través de conectores de diferente longitud. El comportamiento de los dominios formando parte del tándem es diferente al de los dominios individuales (Damer & Creutz, 1994; C. S. Evans *et al.*, 2016). La dificultad de obtener estructuras cristalinas de los dominios dispuestos en tándem ha limitado su capacidad de estudio.

La determinación de la estructura cristalina de C2AB de sinaptotagmina 3 (Sutton, Ernst, & Brunger, 1999) y de C2AB de sinaptotagmina 1 (Fuson *et al.*, 2007) ha permitido comprobar que la diferente orientación de los dominios C2A y

Introducción y Objetivos

C2B resulta esencial y característica para el desempeño de la actividad de la proteína. En el caso de C2AB de sinaptotagmina los dominios C2A y C2B están orientados uno respecto al otro unos 108° respecto a su eje, y se han identificado una serie de interacciones entre los dos dominios. Para esta proteína se han descrito dos conformaciones, la conformación "cerrada" incompatible con la unión a calcio y conformación "abierta" (Fuson *et al.*, 2007). Por otro lado la estructura cristalina de C2AB de sinaptotagmina 3 presenta una disposición de los dominios C2A y C2B dispuestos de modo que no hay interacción entre los dominios (Sutton *et al.*, 1999). Esta distinta orientación de los dominios influye en la capacidad de unión a calcio y fosfolípidos diferente a lo observado en los dominios individuales.

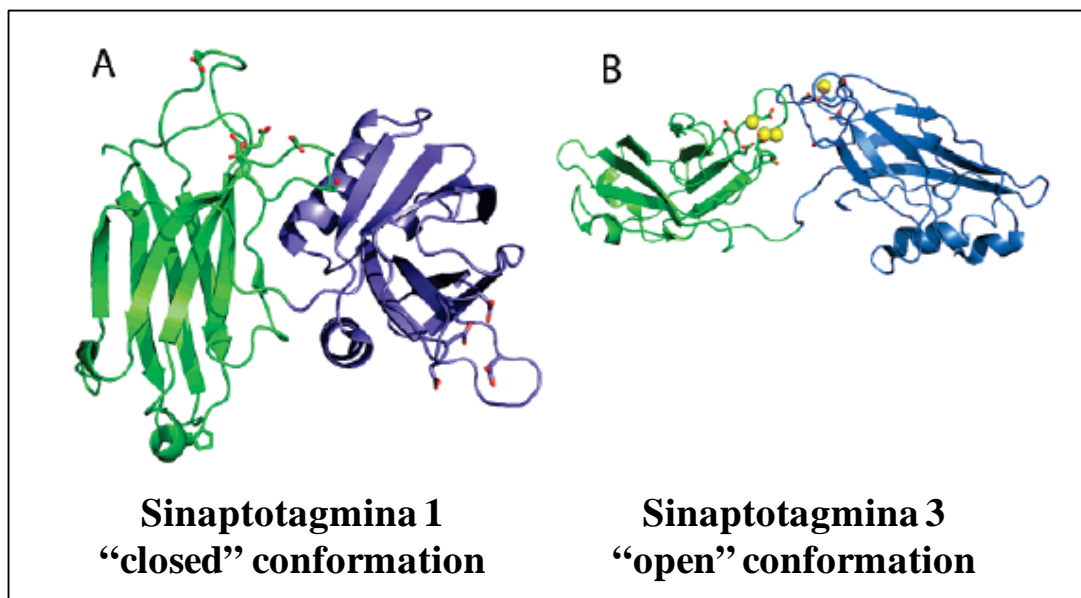


Figura I.11: A) Estructura de C2AB de sinaptotagmina 1. El dominio C2A aparece coloreado en verde y el C2B en azul oscuro. Los residuos implicados en la unión con calcio aparecen representados como varillas. Ambos dominios están dispuestos con un ángulo de 108° respecto al eje. B) Estructura de C2AB de sinaptotagmina 3. El C2A aparece coloreado en verde y el C2B en azul claro. La estructura se muestra con el calcio unido, representado como esferas amarillas. Imagen tomada de Fuson *et al.*, 2007.

2.-FOSFATIDIL INOSITOL 4,5-BISFOSFATO, PI(4,5)P₂.

El fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfato (PI(4,5)P₂) es el fosfoinosítido más abundante en la membrana plasmática de células de mamíferos constituyendo así el 1% del total de lípido (Figura I.12) (Stephens, Jackson, & Hawkins, 1993). Este

fosfolípido regula una gran variedad de procesos celulares a pesar que se encuentra en muy pequeñas cantidades en la membrana plasmática. El PI(4,5)P₂ ha sido muy estudiado por su papel en la señalización celular. Inicialmente se pensó que el PI(4,5)P₂ no era más que el sustrato de dos enzimas, la fosfolipasa C (PLC) que generaba inositol (1,4,5)-trisfosfato y diacilglicerol (DAG) (*Jafferji & Michell, 1976*) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que producía PI(3,4,5)-trisfosfato (PIP₃). Posteriormente se vio que el PI(4,5)P₂ también actuaba como segundo mensajero (*Janmey & Stossel, 1987*) y actualmente se conocen cientos de proteínas capaces de interactuar con el PI(4,5)P₂ y actúan como efectores en determinadas vías de señalización. Estas proteínas se localizan en diferentes compartimentos celulares y participan en procesos tales como la adhesión celular (*Janmey & Stossel, 1987*), cambios en el citoesqueleto (*Ling et al., 2007*), polarización y migración celular (*Lacalle et al., 2007; Ling et al., 2007; Mañes, Fuentes, Peregil, Rojas, & Lacalle, 2010; Thapa et al., 2012*), brotes virales (*Alfadhli & Barklis, 2014*), el PI(4,5)P₂ regula la función de los canales iónicos, uniéndose directamente al transportador del receptor de dopamina (hDAT) (*Hamilton et al., 2014*) o estabilizando el complejo formado por el transportador de serotonina humano (*Anderluh et al., 2017*), resulta importante en la secreción y el tráfico vesicular (*Downes, Gray, & Lucocq, 2005*) y de hecho el PI(4,5)P₂ es crucial en los procesos de endocitosis y exocitosis.

Se han descrito varios mecanismos por los que el PI(4,5)P₂ es capaz de interactuar con las proteínas mostrando diferentes grados de especificidad y afinidad con las mismas. La interacción es de tipo electrostático entre los residuos básicos de las proteínas y el fosfoinosítido, puesto que a pH 7.0 éste tiene una carga neta de -4 (*McLaughlin, Wang, Gambhir, & Murray, 2002*).

El sitio por el que este fosfoinosítido se une a los dominios C2 está ampliamente caracterizado, se trata de una región rica en lisinas e igualmente cuando estos residuos son mutados a alaninas se pierde la capacidad de unión entre los dominios C2 y el PI(4,5)P₂ (*Li et al., 2006; Guerrero-Valero et al., 2009 Guillen et al., 2013*). En el caso de la PKC α , mediante inmunofluorescencia se ha observado que cuando la unión a PI(4,5)P₂ era abolida, la proteína era incapaz de traslocarse a la membrana (*Marín-Vicente, Nicolás, Gómez-Fernández, & Corbalán-García,*

Introducción y Objetivos

2008). Por otro lado, la cantidad necesaria de calcio para que sinaptotagmina 1 se una a la membrana es mayor en ausencia de PI(4,5)P₂ sugiriendo la importancia de este fosfoinosítido en la modulación de la afinidad de calcio durante la liberación de neurotransmisores (Li et al., 2006).

Por todo ello, se considera que el PI(4,5)P₂ es importante en la localización de los dominios C2 en la membrana (Sánchez-Bautista, Marín-Vicente, Gómez-Fernández, & Corbalán-García, 2006), sin embargo el modo en el que el PI(4,5)P₂ participa en el proceso todavía está por discernir.

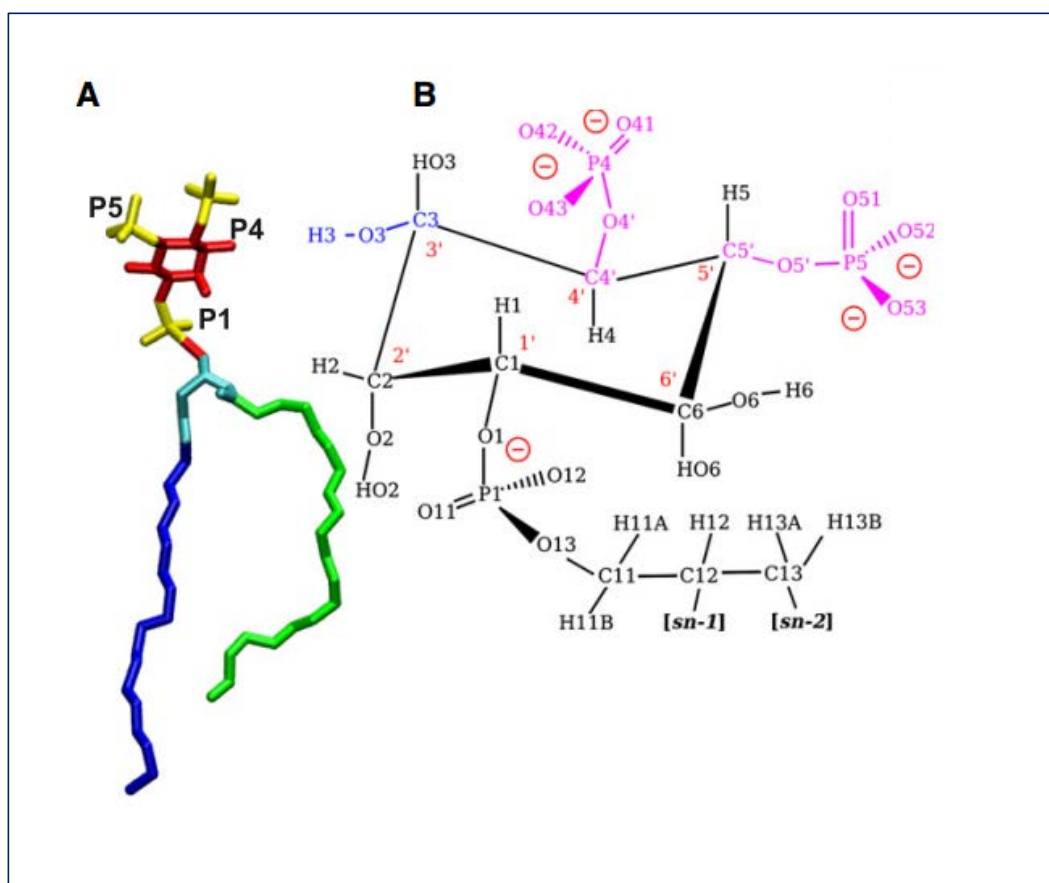


Figura I.12: A) Representación atómica de la molécula de PI(4,5)P₂. La cabeza del anillo del grupo inositol se representa en rojo y los grupos fosfato en amarillo. El glicerol (cyan) conecta la cabeza del inositol con las cadenas de los ácidos esteárico (azul) y araquidónico (verde). B) Esquema del anillo de inositol del PI(4,5)P₂. Imagen tomada de (Lupyan, Mezei, Logothetis, & Osman, 2010).

La primera indicación de la importancia del PI(4,5)P₂ en el proceso de exocitosis dependiente de calcio fue observada en bacterias que expresaban

fosfolipasa C. El resultado era una disminución de este fosfoinositol en la membrana plasmática debido a la escisión de éste en IP_3 y DAG lo que provocaba una inhibición en la secreción dependiente de calcio (*Eberhard, Cooper, Low, & Holz, 1990*).

El $PI(4,5)P_2$ participa en el proceso de preparación de las vesículas, paso previo a la fusión vesicular en el proceso de exocitosis, aunque ello no excluye que pueda participar en otras etapas del proceso. La importancia de este lípido en la exocitosis vesicular se ha observado en ratones carentes en PI(4)P quinasa I γ en los que se observó una reducción de vesículas de núcleo denso preparadas para la fusión (*Gong et al., 2005*). Por otro lado un incremento de la síntesis de $PI(4,5)P_2$ por la activación de la PI(4)5 quinasa aumenta la secreción vesicular (*Aikawa & Martin, 2003; Milosevic et al., 2005*).

Mediante microscopía de super-resolución STED se ha determinado que en la membrana plasmática de las células PC12 aparecen microdominios enriquecidos con $PI(4,5)P_2$ de un tamaño aproximado de 73 nm (*Geert van den Bogaart et al., 2011*).

Se ha determinado que existe un gran número de proteínas que unen $PI(4,5)P_2$ a través de sus dominios con carga positiva como ocurre con los dominios PH o los dominios C2. La afinidad de estos dominios por el fosfoinosítido está aumentada en presencia de calcio (*Corbalán-García et al., 2003; Lemmon, 2008; Martin, 2015*).

Muchas de las proteínas que participan en la exocitosis interaccionan con $PI(4,5)P_2$. Estudios recientes han demostrado que la proteína STX1A-H3 que forma parte del complejo SNARE es capaz de unir $PI(4,5)P_2$ que a su vez sería capaz de interaccionar a través de la región polibásica del dominio C2B de sinaptotagmina 1, de este modo estaría posicionando a la proteína en la membrana antes de la llegada de calcio (*Honigmann et al., 2013*).

Mediante estudios de cromatografía de afinidad de extractos de membranas de gránulos de células cromafines con $PI(4,5)P_2$ biotinilado y conjugado a avidina se han detectado varias proteínas que contienen dominios C2 como, syt-1, syt- y slp4a/granulofilina. Hay otras muchas proteínas que contienen dominios C2 y que

Introducción y Objetivos

están implicadas en la exocitosis vesicular como DOC2, Munc13-1 o rabfilina 3A. Está demostrado que estas proteínas son capaces de unir este fosfolípido a través de sus regiones polibásicas y que además también interactúan con el complejo SNARE (*Sato et al., 2010; Guillén et al., 2013*).

3.-DOMINIOS C2 Y FUSIÓN A MEMBRANAS.

El estudio de la maquinaria molecular implicada en la fusión vesicular, incluyendo la transmisión sináptica, es un proceso esencial en las células eucariotas y ha permitido conocer la presencia de una gran cantidad de proteínas que participan en este complejo proceso de manera controlada y precisa. Un estudio detallado de estas proteínas reveló que muchas de ellas tenían un motivo estructural común, los dominios C2 (*Emsley et al., 2010; Degtyar et al., 2013*).

La fusión de membranas se considera un proceso fundamental en biología y representa el principal mecanismo de comunicación célula-célula en organismos eucariotas. La exocitosis de vesículas cargadas con neurotransmisores u hormonas en neuronas y células cromafines es dependiente de calcio, respectivamente ha sido uno de los procesos de fusión más investigados debido al gran número de proteínas que intervienen y la importancia que tiene en los organismos (*SØrensen, 2004; Südhof, 2004*).

El tráfico vesicular implica la adquisición de la competencia de la vesícula para que se pueda fusionar con la membrana plasmática. Un potencial de acción induce la apertura de los canales de calcio, que estimula la exocitosis. Después, las vesículas se reciclan mediante varios procesos, siendo uno de ellos la endocitosis. Tras la endocitosis se produce la reacidificación de su interior y el posterior rellenado del contenido vesicular preparándose así para un nuevo proceso de exocitosis (Figura I.13) (*Südhof, 2004*).

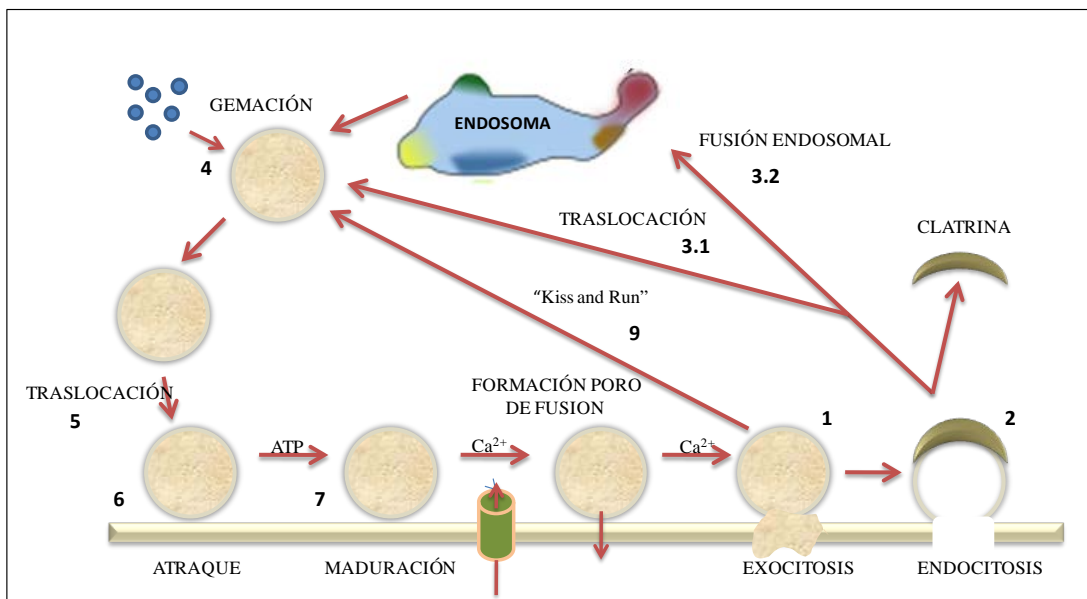


Figura I.13: Ciclo vesicular sináptico. En el proceso de exocitosis regulada la elevación del calcio intracelular es la señal que desencadena el proceso de fusión de membranas. Exocitosis (1), tras este proceso las vesículas son recicladas mediante endocitosis mediada por clatrina (2). Dentro de la célula la vesícula es trasladada (3.1) y cargada con neurotransmisores (NT) (4) o fusionada con un endosoma temprano (3.2) del que mediante gemación se liberan nuevas vesículas que serán cargadas con NT (4). Estas vesículas serán trasladadas a la membrana celular (5) con la que entran en contacto mediante atraque o *docking* (6). Las vesículas experimentan un proceso de maduración o *priming* (7) que las capacita para liberar su contenido gracias a la formación de un poro de fusión (8). El poro de fusión puede volver a cerrarse tras liberar todo o parte del contenido vesicular en un mecanismo conocido como "*kiss and run*" (9). Imagen adaptada de Südhof., 2004.

En las vesículas sinápticas se almacenan neurotransmisores y tienen un tamaño aproximado de 40-50 nm de diámetro (Takamori *et al.*, 2006). Se encuentran en los terminales sinápticos y dependiendo del tipo de sinapsis, el número de vesículas por terminal puede variar entre 100-1000 vesículas. La llegada de un potencial al terminal presináptico provoca la apertura de los canales de calcio regulados por voltaje, lo que provoca un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . Este aumento en la concentración de este ion favorece la fusión de vesículas con la membrana plasmática presináptica lo que conduce a la liberación de neurotransmisores al espacio entre la membrana pre- y post-sináptica (Südhof, 2004; Neher & Sakaba, 2008). Los gránulos son organelas secretoras de un tamaño mayor que las vesículas sinápticas, con un diámetro mayor a 100 nm y se localizan en las células cromafines, células β -pancreáticas y mastocitos, entre otras. La fusión de

Introducción y Objetivos

vesículas sinápticas y la secreción de estos gránulos son considerados como un proceso altamente regulado por calcio.

Las vesículas sinápticas se clasifican en función de su capacidad para comportarse ante la llegada de un estímulo en el proceso de fusión. Se agrupan en los denominados "pool" (Takamori et al., 2006). Las vesículas de liberación inmediata o RRP (*Ready Release Pool*), que están molecularmente preparadas para liberarse inmediatamente ante la llegada de un estímulo, el pool de las vesículas de reciclamiento que se movilizan tras la llegada de un estímulo y las vesículas de reserva o pool de reserva que es aquél que no contribuye a la liberación de neurotransmisores y cuya movilización sólo se consigue si tiene lugar un estímulo de alta intensidad (Rosenmund & Stevens, 1996; Rizzoli & Betz, 2005; Alabi & Tsien, 2012). La acumulación de estas vesículas en un potencial u otro no se sabe si es debida a los propios componentes moleculares de las vesículas (Hua, et al., 2010) o a su posición de las vesículas en el terminal sináptico (Park, Li, & Tsien, 2012).

Con la llegada de un potencial de acción, se produce la apertura de los canales de calcio y se desencadenan una serie de eventos que conducen a la fusión vesicular.

El proceso de exocitosis puede tener lugar en una fase rápida (fase sincrónica), que ocurre en unos pocos milisegundos tras el influjo del calcio y una fase lenta (fase asincrónica), que es capaz de continuar durante un período de cientos de milisegundos. Ambas fases, sincrónica y asincrónica son dependientes de calcio (Hagler & Goda, 2001). Existe una tercera fase de fusión vesicular denominada fase espontánea de liberación que no está desencadenada por un potencial de acción y se considera independiente de calcio (Emptage et al. 2001; Xu, Pang, Shin, & Südhof, 2009).

Los eventos de fusión de las vesículas sinápticas y de los gránulos de secreción son regulados principalmente por el complejo SNARE (Jahn & Scheller, 2006; Südhof & Rothman, 2009). Este complejo es el motor que lleva a cabo la fusión de las vesículas con la membrana está formado por 4 α -hélices que constituyen una estructura en *coiled-coil*: sinaptobrevina/VAMP, dos α -hélices de SNAP25 y otra α -hélice de syntaxina. Estas dos últimas proteínas están ancladas a la

membrana presináptica y constituyen las t-SNARE, mientras que VAMP está anclada a la vesícula sináptica y forma las v-SNARE (Sørensen, 2004). Este complejo es capaz de provocar la fusión espontánea de las vesículas lipídicas *in vitro* (Weber *et al.*, 1998), pero la fusión de vesículas es un proceso mucho más complejo y que precisa de la presencia de otras proteínas que controlen el proceso de fusión vesicular.

Para que tenga lugar el proceso de exocitosis dependiente de calcio, las vesículas deben sufrir un acercamiento espacial a la zona activa (*docking*) y una vez en esta región se produce el ensamblaje del complejo SNARE que prepara a las vesículas (*priming*) (Südhof, 2012). Son cuatro las proteínas implicadas en el proceso de preparación de las vesículas, RIM, Munc13 y Rab3 ó Rab27 y la proteína Munc18 (*Sec1/Munc18 like*, SM). En un primer paso la unión entre Rab3 a RIM dependiente de GTP formaría un complejo heterotrimérico entre la proteína Rab y el heterodímero formado por RIM/Munc13. La proteína Munc13 está sometida a una regulación adicional por calcio que se une a los dominios C2 de la proteína y por diacilglicerol por su dominio C1 que anclaría de forma física a la proteína a la zona activa de la membrana. Posteriormente Munc13 se activaría por calcio y diacilglicerol, aproximando la vesícula a la zona de fusión y a continuación Munc18 iniciaría la formación del complejo SNARE, de este modo la vesícula adquiere la competencia exocitótica (Figura I.14).

Introducción y Objetivos

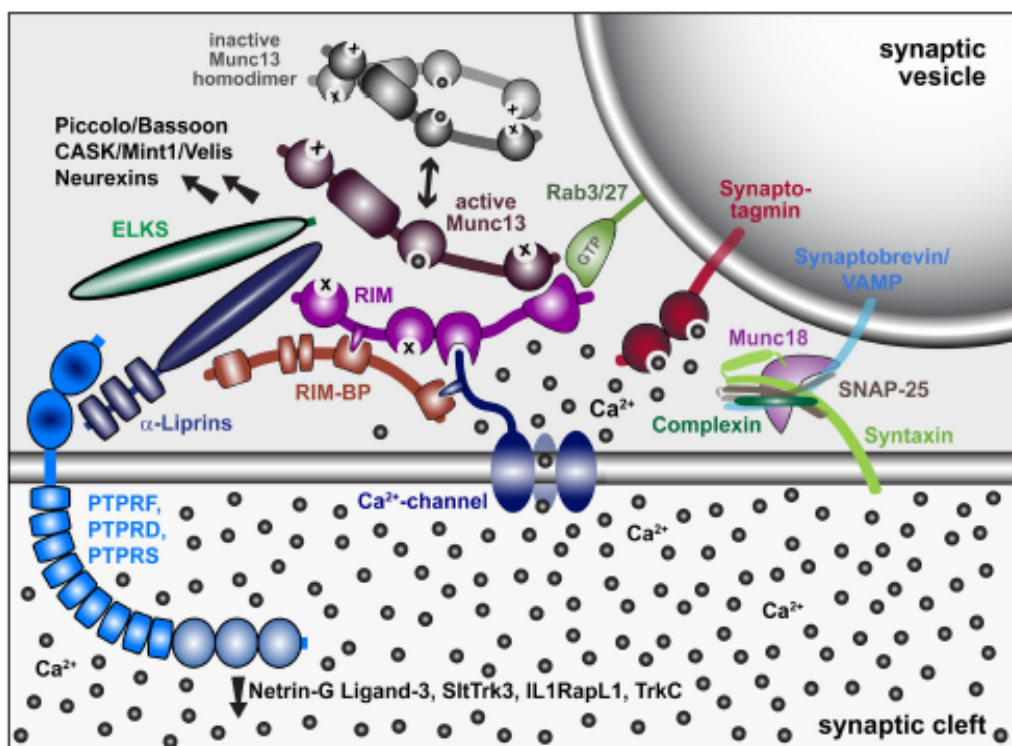


Figura I.14: Esquema ilustrativo de la zona activa y su relación con la vesícula sináptica en el proceso de la fusión vesicular. (Imagen tomada de (Südhof, 2012)).

La dependencia de calcio para la fusión de vesículas sinápticas y gránulos de secreción es promovida por sensores de calcio que transmiten la señal de la presencia de este ion para que tenga lugar la fusión.

El primer sensor de calcio identificado fue la sinaptotagmina 1 (Perin, et al., 1990; Fernández-Chacón et al., 2001). La sinaptotagmina 1 se localiza en las vesículas sinápticas y gránulos de secreción asociadas a través de su región amino terminal (Nt) transmembrana. Esta proteína se caracteriza por la presencia de dos dominios C2 dispuestos en tándem en el extremo carboxilo terminal (Ct). Estos dominios unen calcio a través de la CBR coordinándose con los residuos ácidos de esta zona (Fernández-Chacón et al., 2001; Chapman, 2002). En solución, la afinidad por calcio es muy pequeña, sin embargo la presencia de membranas cargadas negativamente aumenta significativamente la afinidad por este ion, actuando esta proteína como sensor de calcio *in vivo*. El dominio C2B de sinaptotagmina 1 es capaz de interactuar de forma Ca²⁺-independiente de una forma débil con el

complejo SNARE (*Chapman, 2002; Martens & McMahon, 2008; Rickman et al., 2006*), implicado en el proceso de amarre a la membrana de los gránulos de secreción (*de Wit et al., 2009*). La capacidad de unión es independiente de calcio, aunque la presencia de este ion aumenta la afinidad entre ambas (*Choi et al., 2010; Lai, et al., 2011*). En neuronas que carecen de sinaptotagmina 1, no se observa la liberación sincronizada de neurotransmisores, sin embargo aumenta la liberación espontánea y asincrónica de estos (*Geppert et al., 1994; Fernández-Chacón et al., 2001*). En el caso de las células cromafines la pérdida de sinaptotagmina 1 inhibe la rápida liberación de neurotransmisores, mientras que se mantiene la liberación lenta de neurotransmisores (*Schonn, Maximov, Lao, Südhof, & Sørensen, 2008*). Estos datos sugieren que el calcio sería la señal necesaria para que tuviera lugar el proceso de fusión. Existen evidencias de que el complejo SNARE estaría parcialmente formado en un paso previo a la presencia de calcio, esto explicaría que la interacción del dominio C2B de sinaptotagmina con el complejo SNARE ocurriera de forma independiente de calcio. En células cromafines se ha determinado que el complejo pre-ensamblado SNAP25/STX1A-H3 era necesario para que tuviera lugar el amarre de la vesícula a la membrana y para el proceso de preparado de las vesículas (*priming*) sería necesario que el complejo SNARE estuviera formado por SNAP25/STX1-H3/VAMP2 (*de Wit et al., 2009*). Este modo de pre-ensamblaje explicaría la rapidez de actuación del proceso de fusión ante la llegada del calcio. El complejo SNARE estaría inhibido por complexina (*Jahn & Fasshauer, 2012*).

Otro sensor del calcio serían las proteínas DOC2, que fueron identificadas hace dos décadas como proteínas citosólicas (*Orita et al., 1995*). Se han descrito tres isoformas, de las cuales DOC2A y DOC2B se unen a membrana de forma calcio dependiente, mientras que una tercera isoforma, DOC2c no es capaz de unirse a fosfolípidos de forma calcio dependiente (*Mitsunori Fukuda & Mikoshiba, 2000*). Estas proteínas están formadas por dos dominios C2 dispuestos en tándem conectados a través de un conector. Por el extremo amino terminal interaccionan con la proteína Munc13 a través de un dominio denominado MID (*Munc Interacting Domain*). Estas proteínas presentan una mayor afinidad por calcio que la sinaptotagmina 1. Las proteínas DOC2 son capaces de interaccionar con otras proteínas que participan en la exocitosis, syntaxina 1, Munc18, Munc13, entre otras

Introducción y Objetivos

(Orita et al., 1997; Verhage et al., 1997; Ke, Oh, & Thurmond, 2007). Participan en el proceso de preparado de las vesículas (*priming*) en la exocitosis y el reciclado de nuevas vesículas, regulando así la exocitosis, evitando una fusión prematura de vesículas (Friedrich et al., 2008; Pinheiro et al., 2013). Cuando no hay DOC2B el proceso de preparado de vesículas continúa, sugiriendo que podría haber algún sustituto de esta proteína que pudiera suplementar esta función (Pinheiro et al., 2013). La proteína rabfilina 3A y DOC2B pertenecen a la misma rama en el árbol filogenético (Friedrich, Yeheskel, & Ashery, 2010) y además de presentar una elevada homología estructural, podría desempeñar un papel similar al descrito en DOC2 en el proceso de preparado de vesículas, como se demuestran en su capacidad para acercar a las vesículas a la membrana de las células PC12 e intervenir en el proceso de reciclado de nuevas vesículas (Deak et al., 2006; Tsuboi, Kanno, & Fukuda, 2007).

En neuronas, DOC2B estimula la liberación espontánea de neurotransmisores (Groffen et al., 2010), mientras que sinaptotagmina 1 estimula la liberación sincronizada de neurotransmisores, sugiriendo que DOC2B podría participar en la liberación de neurotransmisores en un proceso temprano en el reclutamiento de las vesículas a la membrana (Pang et al., 2011). También se ha determinado que esta proteína participa en la liberación asincrónica de neurotransmisores en neuronas, de hecho se disocia de la membrana de un modo lento una vez que el flujo de calcio decae (Yao, Gaffaney, Kwon, & Chapman, 2011). Varios aspectos de esta proteína han de ser más profundamente estudiados para ser entendidos.

En el proceso de secreción neuroendocrina se han identificado otras proteínas que actuarían como sensores de calcio aludiendo su participación en diferentes etapas del proceso de liberación del contenido vesicular. Así, mientras como se ha descrito en este capítulo la sinaptotagmina 1 sería el principal sensor de calcio, otras proteínas como las PKCs y Munc13 también actuarían como sensores de calcio. Estas proteínas no son capaces de provocar la fusión por ellas mismas, sino que tendrían que interaccionar con otras proteínas, lo que explicaría que el modo de participación en la liberación de neurotransmisores sea más lento. Las proteínas DOC2, sinaptotagmina 7 o rabfilina 3A, tienen una elevada afinidad por calcio y son capaces

de desencadenar la fusión *in vitro*. Su función estaría restringida a la fase de preparación vesicular aunque no está claro que puedan participar en otros procesos de la exocitosis. Para entender el papel de estos diferentes sensores de calcio es necesario considerar que estas proteínas podrían operar en diferentes escalas espacio-temporal en el complejo proceso de exocitosis y fusión vesicular.

4.- Complejo SNARE.

Las proteínas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*) participan en la mayoría de los procesos de tráfico de membrana y destaca de ellas la presencia de motivos SNARE (*Josep Rizo & Rosenmund, 2008*). Estas moléculas son componentes esenciales de la maquinaria molecular, sin embargo es necesaria la presencia de otras proteínas presinápticas para terminar de llevar a cabo el proceso de fusión.

- **SINTAXINA 1A.**

Se trata de una proteína de membrana que presenta 3 dominios, el dominio H_{abc} que interacciona con la Munc18-1 y que está constituido por 3 α -hélices antiparalelas, seguido de una zona de unión que conecta con el motivo SNARE (Qa) y finalmente se ancla a la membrana presináptica a través de una región transmembrana (TMR) (*Lerman, Robblee, Fairman, & Hughson, 2000*). El dominio H_{abc} localizado en la región N-terminal permite a la proteína estar en dos estados conformacionales, uno cerrado donde el dominio H_{abc} está plegado junto al motivo SNARE impidiendo así el ensamblado del complejo SNARE y la conformación abierta donde se libera el motivo SNARE que permite la unión a otras proteínas y formar el complejo SNARE. El extremo N-terminal de syntaxina-1 que interacciona con Munc18-1 es esencial para que se pueda llevar a cabo la fusión de las tres proteínas que constituyen el complejo SNARE *in vivo* (*Josep Rizo & Südhof, 2012*) (Figura I.15).

Introducción y Objetivos

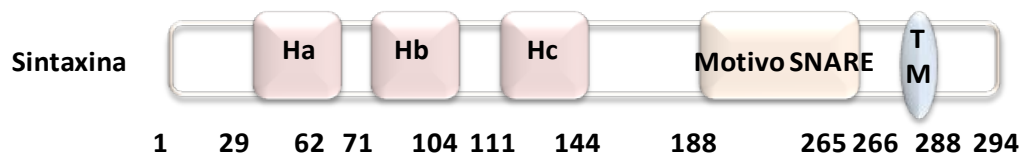


Figura I.15: Sintaxina (STX1A). Desde el extremo Nt al extremo Ct. En el extremo Nt está el dominio Habc y en el extremo Ct se encuentra el motivo SNARE y la región transmembrana (TM).

- **SNAP25.**

SNAP25 (*SyNaptosomal-Associated Protein-25*) es uno de los componentes del complejo SNARE y tiene un tamaño de 25 kDa. Ejecuta directamente la formación del complejo SNARE que atrae la vesícula sináptica a la membrana plasmática (Josep Rizo & Südhof, 2002). Se trata de una proteína anclada a la cara citosólica de la membrana plasmática a través de las cadenas laterales palmitoiladas del centro de la molécula (Jahn & Scheller, 2006). Esta proteína proporciona dos hélices α a la formación del complejo SNARE y existen evidencias que demuestran que es capaz de interactuar con el dominio C2B de proteínas como sinaptotagmina y rabfilina 3A (Josep Rizo et al., 1999 Chapman, 2008) (Figura I.16).

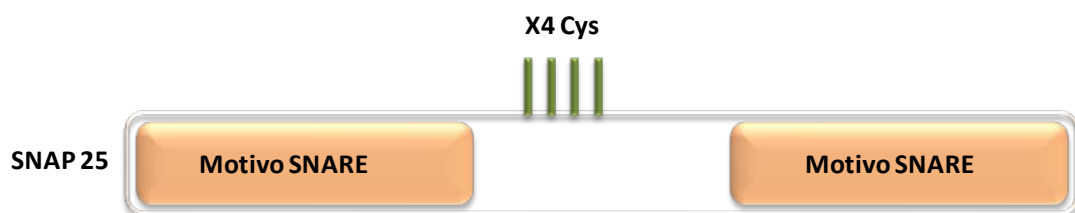


Figura I.16: SNAP25. Presenta dos motivos SNAREs y se encuentra anclada a la membrana presináptica a través de 4 residuos de cisteínas que están palmitoilado en su región central.

- **SINAPTOBREVINA o VAMP2.**

Se trata de pequeñas proteínas plasmáticas que forman parte de la familia VAMP (*Vesicle-Associated Membrane Protein*). De las proteínas que forman el

complejo SNARE, es la única que está situada en la vesícula, v-SNARE. Son diana de la rotura selectiva producida por la toxina botulínica tipo D y F que bloquea la transmisión sináptica al romper la proteína y bloquear la liberación de los neurotransmisores (Hayashi *et al.*, 1994) (Figura I.17).

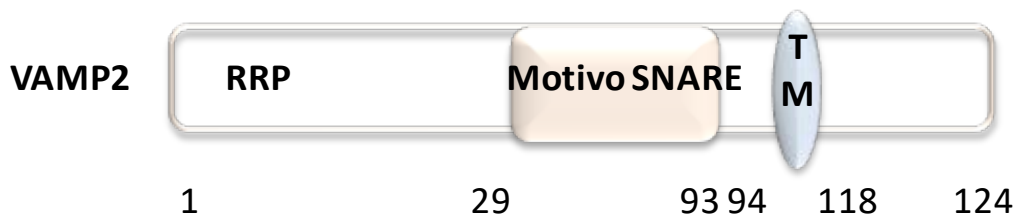


Figura I.17: VAMP2. Desde el extremo Nt al extremo Ct se observa la región rica en prolinas (RRP) y el motivo SNARE. En el extremo Ct se encuentra la región transmembrana (TM).

La cristalización del complejo SNARE (Fasshauer, Sutton, Brunger, & Jahn, 1998) reveló que estaba formado por cuatro hélices α que forman una estructura en *coiled-coil*. SNAP25 aporta dos motivos SNARE, mientras que STX1A y VAMP2 aportan un motivo SNARE cada una (Figura I.18).

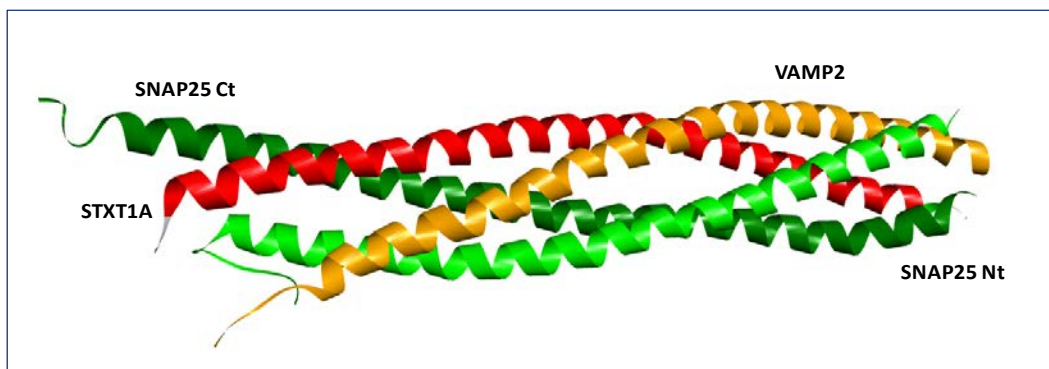


Figura I.18: Estructura del complejo SNARE. Las tres proteínas interactúan formando una estructura conocida como *coiled-coil*. SNAP25 forma dos hélices del *coiled coil* del complejo SNARE mientras que VAMP2 y Sintaxina aportan una hélice α cada una al complejo SNARE. Se ensamblan desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxilo terminal en un proceso denominado *zippering*. (Imagen adaptada de PDB: 2N1T con BIOVIA Discovery Studio 2016).

Introducción y Objetivos

En esta compleja maquinaria participan una gran cantidad de proteínas las cuales comparten un motivo estructural común, los dominios C2. Estas proteínas son capaces de unir calcio, fosfolípidos e interactuar con otras proteínas. Todo este mecanismo está finamente regulado (*Brunger, Weninger, Bowen, & Chu, 2009*). A pesar de que estas proteínas presentan una elevada homología estructural, el papel que desempeñan los distintos dominios C2 en su unión con este complejo son diferentes lo que les permite participar en diferentes etapas de la exocitosis como la liberación sincrónica, asincrónica y espontánea de los neurotransmisores (*Brunger et al., 2009*).

Las principales proteínas reguladoras del proceso de fusión son Munc13, Munc18, sinaptotagmina y complexina, siendo la sinaptotagmina 1 el principal sensor del calcio en este proceso. En cuanto al complejo SNARE algunos autores sugieren que este complejo se encuentra parcialmente ensamblado. Según esta teoría la barrera energética que impide la formación de este complejo sería vencida cuando el calcio se une a los dominios C2 de sinaptotagmina (*Südhof, 2013*). Otros autores basados en estudios de tomografía electrónica proponen un modelo en el que el complejo SNARE está totalmente desensamblado. Según este modelo la sinaptotagmina estaría unida a la membrana plasmática a través de la interacción con PI(4,5)P₂, con el complejo SNARE o ambos y sería la llegada de calcio la que provocaría la aproximación de la membrana y la vesícula permitiendo así a formación del complejo (*Jahn & Fasshauer, 2012*).

Es importante conocer cómo se produce la fusión y el papel que desempeñan las diferentes proteínas que aparecen en este escenario y cómo son capaces de adaptarse a diferentes estímulos.

5.- RABFILINA 3A y el complejo SNARE.

La rabfilina 3A, proteína objeto de estudio de esta Tesis Doctoral es una proteína de tráfico de membrana que está implicada de manera dependiente de Ca²⁺ en la regulación de la exocitosis de vesículas secretoras en neuronas y células neuroendocrinas (*Shirataki et al., 1993; McKiernan, Stabila, & Macara, 1996*).

Fukuda, Kanno, & Yamamoto, 2004). Se trata de una proteína que contiene un doble dominio C2 en su extremo carboxilo terminal y fue identificada por primera vez por su capacidad para interactuar con Rab3A en su forma activa con GTP unido (*McKiernan et al., 1996*). Se localiza en las vesículas sinápticas o secretoras por medio de la interacción a través de su extremo amino-terminal con las proteínas Rab3 y Rab27 (*Mitsunori Fukuda, 2013*) e interviene en el reciclado de nuevas vesículas durante el período de recuperación una vez que ha tenido lugar la liberación de neurotransmisores. Se ha demostrado que interactúa de manera directa con SNAP25 a través del dominio C2B resultando la interacción con SNAP25 un paso crítico en la regulación de la liberación de neurotransmisores (*Tsuboi & Fukuda, 2005; Deák et al., 2006*). Recientemente se ha demostrado que además del papel de rabfilina 3A en el tráfico vesicular es capaz de actuar a nivel post-sináptico estabilizando la interacción del receptor GluN2A con la proteína PSD-95 (PDZ3) (*Burns et al., 1998*). Por otro lado, también se ha visto que en células endocrinas, la rabfilina 3A es capaz de controlar la secreción de hormonas a través de la proteína efectora Rab27 y MyoVa y su dominio de unión a Rab (*Burns et al., 1998*). En base a estos datos rabfilina 3A tendría un papel multi-regulador en diferentes procesos del ciclo sináptico.

A nivel patológico se ha relacionado la disfunción en rabfilina 3A y el complejo SNARE con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington y la enfermedad de Parkinson así como en los cuerpos de Lewy, en los que se ha observado una ausencia entre Rab3A y Rph3A debido a la interacción entre Rab3A- α -sinucleína y una menor interacción entre Rab3A y Rph3A, desplazado por la formación del complejo Rab3A- α -sinucleína respectivamente (*Smith et al., 2007; Chen et al., 2013*). También existe una relación entre la enfermedad de Alzheimer con rabfilina 3A y el complejo SNARE (*Tan et al., 2014*). Mediante el análisis post-mortem del neocórtex en pacientes con la enfermedad de Alzheimer en los que se midieron los niveles de rabfilina 3A, Rab3A así como las proteínas del complejo SNARE, se encontró una correlación entre los niveles de la proteína rabfilina 3A y un incremento de las placas β -amiloide (*Tan et al., 2014*).

Introducción y Objetivos

Hasta ahora la interacción entre rabfilina 3A y SNAP25 sólo se había determinado mediante resonancia magnética nuclear (RMN) (Deák *et al.*, 2006) determinándose que la estequiometría del complejo era 1:1, la interacción no requería calcio y esta tenía lugar a través de la α -hélice del dominio C2B de rabfilina 3A. Algunos experimentos de inmunoprecipitación sugieren que la rabfilina 3A podría interactuar con el complejo SNAP25-STX1A-H3 (Tsuboi & Fukuda, 2005; Deak *et al.*, 2006), aunque la naturaleza transitoria de la interacción y la dificultad de determinar estructuras cristalinas ha limitado su estudio hasta ahora.

A pesar de la similitud estructural de las diferentes proteínas que presentan dominios C2, se observa un diferente comportamiento frente al proceso de liberación del contenido vesicular, que puede ser exocitosis sincrónica, asincrónica o espontánea así como en otros procesos sinápticos. Así mientras sinaptotagmina 1 es el principal sensor de calcio y participa en la liberación rápida de neurotransmisores (Hui *et al.*, 2005), DOC2A y DOC2B están implicados en la liberación asincrónica y espontánea (Groffen *et al.*, 2010; Yao, Gaffaney, Kwon, & Chapman, 2011). La proteína DOC2 y rabfilina 3A (Groffen *et al.*, 2006) comparten un 80% de homología lo que sugiere que rabfilina 3A podría participar en la exocitosis asincrónica o espontánea como la proteína DOC2.

Estas proteínas con dominios C2 identificadas en el tráfico vesicular y la exocitosis parece que participan en diferentes etapas del ciclo vesicular. Aunque *in vitro* una proteína pueda sustituir a otra, no significa que esta interacción pueda ocurrir a nivel fisiológico puesto que estas proteínas están dispuestas en una orientación adecuada para llevar a cabo su función, sirviendo como punto de control en el proceso del ciclo vesicular.

6.- OBJETIVOS.

La presente Tesis Doctoral tiene como objeto principal estudiar la caracterización estructural y funcional de la rabfilina 3A. Esta proteína es característica por presentar dos dominios C2 dispuestos en tándem, al igual que otras muchas proteínas que participan en el proceso de fusión vesicular y exocitosis. La rabfilina 3A es capaz de unir Ca^{2+} , fosfolípidos de membrana e interactuar con otras proteínas. El papel que desempeña esta proteína en el proceso de fusión y exocitosis está todavía por esclarecer. Mediante los estudios bioquímicos y biofísicos llevados a cabo en este trabajo, se pretende determinar cómo la rabfilina 3A se une a membranas modelo, la importancia del calcio en este proceso, así como el papel que ocupa en el escenario de la fusión vesicular y exocitosis a través de la interacción con otras proteínas.

Los objetivos propuestos en este trabajo son los siguientes:

- 1.- Caracterización de la unión de calcio a los dominios aislados C2A y C2B y al tándem C2AB de rabfilina 3A.
- 2.- Caracterización de la interacción de los dominios C2A, C2B y C2AB de rabfilina 3A con la membrana.
- 3.- Estudio de la capacidad de inducir agregación de vesículas lipídicas del dominio C2AB de rabfilina 3A.
- 4.- Caracterización de la unión entre el tándem C2AB de rabfilina 3A con SNAP25 y el complejo SNARE.

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

1.-MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

1.1.- MEDIOS DE CULTIVO.

- **Luria-Bertani (LB):** Se trata del medio de cultivo líquido utilizado de forma habitual en la producción bacteriana. Este medio está formado por la mezcla de 0.5% (p/v) de extracto de levadura, 1% (p/v) triptona, 1% (p/v) de cloruro sódico.
- **LB-agar:** El medio LB sólido se preparó añadiendo agar a una concentración final de 1.5% (p/v).
- **SOC:** el medio SOC (Superóptimo con represión por catabolito). Este medio se empleó para el paso final de la transformación celular bacteriana con la finalidad de obtener una eficacia de transformación máxima en *E.coli*. Fue preparado con 0.5% (p/v) de extracto de levadura, 15 (p/v) de triptona, 10mM cloruro sódico, 2.5 mM cloruro potásico, 10 mM cloruro de magnesio, 10mM sulfato magnésico y glucosa a 2 mM.

La esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo por tratamiento térmico en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

1.2.-ANTIBIÓTICOS.

Para la selección de bacterias transformantes resistentes, los medios de cultivo anteriormente citados fueron suplementados con antibióticos, los cuáles fueron añadidos al medio estéril a partir de una solución concentrada conservada a -20°C.

- **Ampicilina:** (sal sódica, Sigma), se preparó a una disolución concentrada de 100 mg/ml en agua bidestilada y se esterilizó por filtración.
- **Kanamicina:**(sulfato ácido, Sigma), se preparó a una disolución concentrada de 50 mg/ml en agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

1.3-TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.

El fenómeno de transformación bacteriana es un proceso de vital importancia en biología molecular. Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral empleamos células competentes comerciales, para llevar a cabo este proceso, pero la competencia también se puede inducir en el laboratorio mediante un tratamiento de las bacterias previo a la transformación, en el cual se induce un estado transitorio que permite la adquisición de DNA. Se tratan las cepas de *E.coli* BL21(DE3) y DH10B con sales como el MgCl₂ y el CaCl₂ lo que permite que se conviertan en competentes por choque térmico.

- Las células *E.coli* One Shot[®] (Invitrogen). Se trata de células con una eficacia de transformación de 1×10^9 ufc/ μ g de DNA plasmídico que resultan ideales para la clonación y la propagación plasmídica de alta eficacia. Son similares a las células de la cepa DH10B. Para la transformación se utilizaron entre 1-3 μ l de la reacción de clonaje para transformar una alícuota de 50 μ l de células. Las células junto con el plásmido se incubaron durante 30 minutos en hielo. A continuación fueron sometidas a un choque térmico durante 30 segundos a 42°C e incubadas en hielo durante 2 minutos. Se añadieron 500 μ l de medio de cultivo SOC y se agitaron a 200 rpm durante 1 hora a 37°C. A continuación se hicieron varias diluciones con el fin de evitar la contaminación cruzada entre colonias y se sembraron sobre placas de LB-agar que contenían el antibiótico selectivo, dejándose incubar durante 16-20 horas a 37°C.
- Las células *E.coli* BL21 Star[®] (DE3) (Invitrogen). Estas células se han diseñado para aplicaciones que requieren elevados niveles de expresión de proteínas recombinantes a partir de sistemas de expresión con bajo número de copias basados en el promotor T7. Se empleó un vial de 50 μ l de células y se transformó con 2-5 μ l del plásmido correspondiente. Tras la incubación durante 30 minutos en hielo se realizó un choque térmico de las células durante 45 segundos a 42°C y se pusieron en hielo durante 2 minutos. Se añadió

Materiales y Métodos

1 ml de LB y se incubaron durante 1 hora a 37°C. La mezcla de transformación se inoculó en placas de LB-agar que contenían el antibiótico selectivo, y se dejaron incubando durante 16-20 horas a 37°C.

- Las células *E.coli* XL-Gold (Stratagene). Estas células se emplearon en el último tratamiento del proceso de mutagénesis dirigida. Se descongelaron 45 µl de las células XL-Gold en hielo a las que se añadió 2 µl de β-mercaptoetanol y se incubaron en hielo durante 2 minutos. A continuación se añadieron 4 µl de la reacción de mutagénesis y fueron incubadas durante 30 minutos en hielo. Tras esto fueron sometidas a un choque térmico de 30 segundos a 42°C e incubadas en hielo durante 2 minutos más. Finalmente, se añadieron 0.9 ml de LB o medio SOC y se incubaron durante 1 hora a 37°C en agitación. Transcurrido este tiempo se hicieron diluciones y se sembraron en placas de LB-agar que contenían el antibiótico selectivo y se dejaron durante 16-20 horas a 37°C.

1.4.- VECTORES DE EXPRESIÓN.

Para la clonación de los fragmentos génicos se emplearon diferentes vectores con el fin de obtener las proteínas recombinantes generadas en distintos sistemas de expresión.

- **1.4.1.-Vector de Expresión pET28.**

El plásmido pET28 (plasmid for Expression by T7 RNA polymerase), es un sistema optimizado para la expresión de proteínas en *E.coli*. Se caracteriza porque tiene una serie de elementos que facilitan la fusión de secuencias a etiquetas codificantes de histidina terminales, como la inducción de la expresión proteica controlada. En conjunción con el genoma de *E.coli* BL21 completa un sistema de expresión basado en el operón lac, y por tanto, inducible por isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). El sistema tiene una zona de policlonaje con varias

secuencias diana de enzimas de restricción. Esta zona está precedida por el operador del operón lac y una secuencia promotora que es reconocida por la RNA polimerasa del fago T7. Contiene la secuencia codificante de 6 histidinas que permite su purificación posterior mediante cromatografía de alta afinidad, así como una secuencia terminadora de la transcripción. El sistema se completa introduciéndolo en organismos que porten el gen de la mencionada polimerasa en su genoma bajo el control del promotor lac que es inducible por IPTG. El plásmido también aporta el gen lacI, cuyo producto proteico inhibe de forma constitutiva el sistema, ya que actúa tanto en cis respecto al inserto como en trans respecto al gen de la RNA polimerasa de T7.

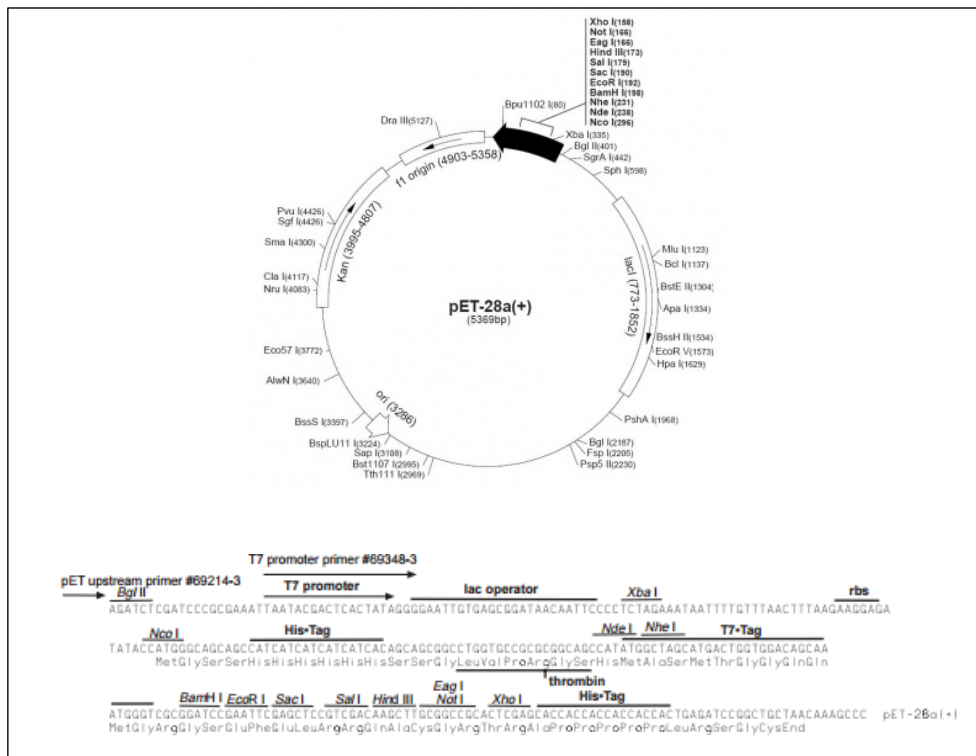


Figura II.1: Mapa del vector pET28a. Se muestra el cassette de resistencia a kanamicina, origen de replicación y una región de policlonaje diseñada para la expresión de una ORF controlada por el sistema basado en la RNA polimerasa del fago T7 y del operón lac.

Los dominios aislados C2A y C2B, así como el tándem C2AB y el SNAP25-N y SNAP25-C fueron subclonados en este vector.

• **1.4.2.-Vector de expresión pET15b.**

El plásmido pET15b (Plasmid for Expression by T7 RNA polymerase), es un sistema optimizado para la expresión de proteínas en *E.coli* que confiere resistencia a ampicilina. Se caracteriza porque tiene una serie de elementos que facilitan la fusión de secuencias a etiquetas codificantes de histidina terminales, lo que permite la purificación de la proteína recombinante en columnas de afinidad. Se trata de un sistema muy parecido al pET28a con la diferencia de que es selectivo frente a ampicilina. Al promotor se le une el represor LacI y una secuencia que codifica la proteína a la que se fusionará el dominio C2 y que permitirá su purificación, la cola de 6 histidinas. Los fragmentos insertados sólo se expresaran en presencia de un agente inductor, IPTG y de una fuente de T7 RNA polimerasa. Para ello hemos utilizado la cepa de *E.coli* BL21 (DE3) puesto que en ella la expresión de T7 RNA polimerasa también se encuentra bajo control del operón lac. De este modo se establece un doble control puesto que tanto la expresión de la polimerasa como la de la proteína recombinante requieren la presencia del inductor.

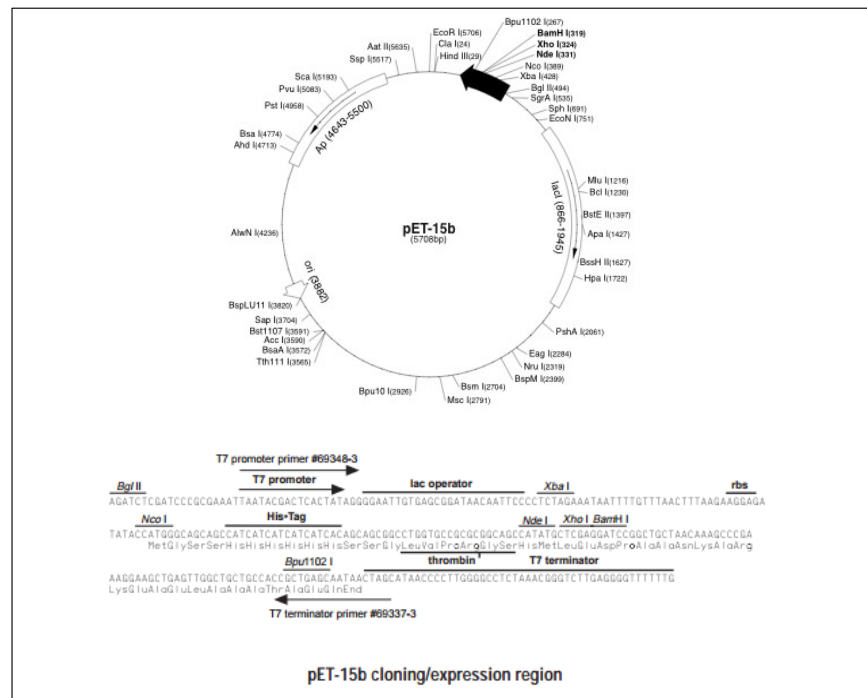


Figura II.2: Mapa del vector pET15b, resistente a ampicilina, operón lac y el promotor T7.

Los genes clonados en pET15b están bajo el control de la transcripción del bacteriofago T7. La expresión de proteínas recombinantes ocurre en células *E.coli*, es inducida por T7 RNA polimerasa que a su vez también se halla bajo control del operón lac.

El SNAP25 completo, así como STX1A y VAMP2 fueron subclonadas en este vector.

1.5.-ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS.

Los geles de agarosa se prepararon a la concentración adecuada para cada caso concreto (en nuestros experimentos generalmente hicimos los geles de agarosa entre el 0.7% y 1%). Para ello se diluyó una cantidad adecuada de agarosa en tampón de electroforesis TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 2mM, pH 8.5), la mezcla fue hervida y depositada para la formación del gel. Se añadieron 3 µl de Serva DNA staining, colorante empleado como sustituto del bromuro de etidio de menor toxicidad.

A las muestras de DNA se añadió tampón de carga, azul de bromofenol 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v), Tris 0.5 mM pH 8.0. El glicerol favorece el depósito de la muestra, mientras que el colorante indica el avance del frente durante la electroforesis. Para comprobar el tamaño de las muestras se empleó un marcador de peso molecular (Gene Ruler Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos). La electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente de 90V durante aproximadamente unos 60 minutos. Para visualizar el DNA separado mediante electroforesis se coloca el gel en un transiluminador de luz UV y se captó la imagen con una cámara digital KODAK. Las bandas fueron analizadas con el programa Analyzer/Gels de FIJI-ImageJ.

1.6.-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DNA.

1.6.1.-Determinación espectrofotométrica.

Consiste en registrar el espectro de absorción en la región de 200 a 320 nm. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/ml de DNA de doble cadena y a 40 µg/ml de DNA de cadena sencilla.

La pureza del DNA se valora con el coeficiente $A_{260/280}$, que ha de ser cercano a 1.8. Valores inferiores indican contaminación por proteínas y valores superiores contaminación por RNA.

1.7.-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). Mutagénesis dirigida por PCR.

Para obtener las construcciones mutantes de las diferentes regiones del dominio C2AB se siguió el protocolo de mutagénesis dirigida de Stratagene (Quick XL site directed mutagenesis, Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos). Se usó como molde la forma silvestre del dominio C2AB de rabfilina 3A y se sometió a una PCR donde se emplearon los oligonucleótidos que contenían las mutaciones a insertar.

Para cada mutante se realizó una reacción de PCR se sintetizaron nuevas cadenas de DNA utilizando como molde el plásmido que contenía el fragmento de DNA que se desea mutar. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos con las sustituciones en los nucleótidos adecuados.

Se tomó como molde la forma silvestre y se sometió a una PCR con oligonucleótidos que contenían las mutaciones a insertar.

Para cada uno de los mutantes se realizó una reacción de PCR donde se sintetizaron nuevas cadenas de DNA utilizando como molde el plásmido que contenía el fragmento de DNA que se quería mutar. Como cebadores se utilizaron los oligonucleótidos que llevaban las sustituciones en los nucleótidos determinados. Las

condiciones de PCR consistieron en 30 ciclos donde se repite el programa 1) desenrollamiento de las cadenas de DNA, con un paso previo a 95°C durante 2 minutos, al que le sigue el inicio del ciclo con un paso a 95°C durante 1 minuto para conseguir el desenrollamiento, 2) unión por complementariedad de los oligonucleótidos a las cadenas molde durante 1 minuto a temperatura que puede variar de un mutante a otro de 60°-68°C, 3) polimerización de los nucleótidos a 72°C por la polimerasa durante 6 minutos.

La polimerasa empleada en este protocolo fue la PfuUltraHotstart.

El resultado de la reacción de PCR fueron cadenas de DNA recién sintetizadas que se diferenciaban del DNA parental (aquel que no lleva la mutación) por la presencia de una mella en la conexión de sus extremos 5' y 3' y por la ausencia de metilación. Finalmente el producto de la PCR se trató con el enzima DpnI durante 1 hora en un baño a 37°C. Este enzima es una endonucleasa que está incluido en el protocolo de Strategene que actúa sobre los lugares de metilación de las cadenas de DNA por lo que la digestión con este enzima da lugar a la digestión específica del DNA molde (parental) mientras que el DNA recién sintetizado, aquel que lleva las mutaciones deseadas, al no encontrarse metilado no resulta dañado.

Posteriormente se transformó el DNA mutante en células ultracompetentes XL-Gold. Las células transformadas se sembraron en una placa de medio LB-agar con el antibiótico adecuado frente al que tenga resistencia el plásmido utilizado (ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 50 µg/ml), y se incubaron 16 horas a 37°C para dejar crecer las colonias. Aproximadamente 6 colonias de las resultantes elegidas al azar se inocularon en medio LB líquido con el antibiótico adecuado (ampicilina 100 µg/ml o kanamicina 50 µg/ml) y se dejó crecer durante 14-16 horas a 37°C en agitación. Pasado este tiempo se centrifugaron y se aisló el DNA correspondiente a cada colonia. El DNA purificado se envió al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Murcia (Laboratorio de Biología Molecular, SAI). Una vez obtenida la secuencia se procedió a la transformación en células BL21 para producir proteína.

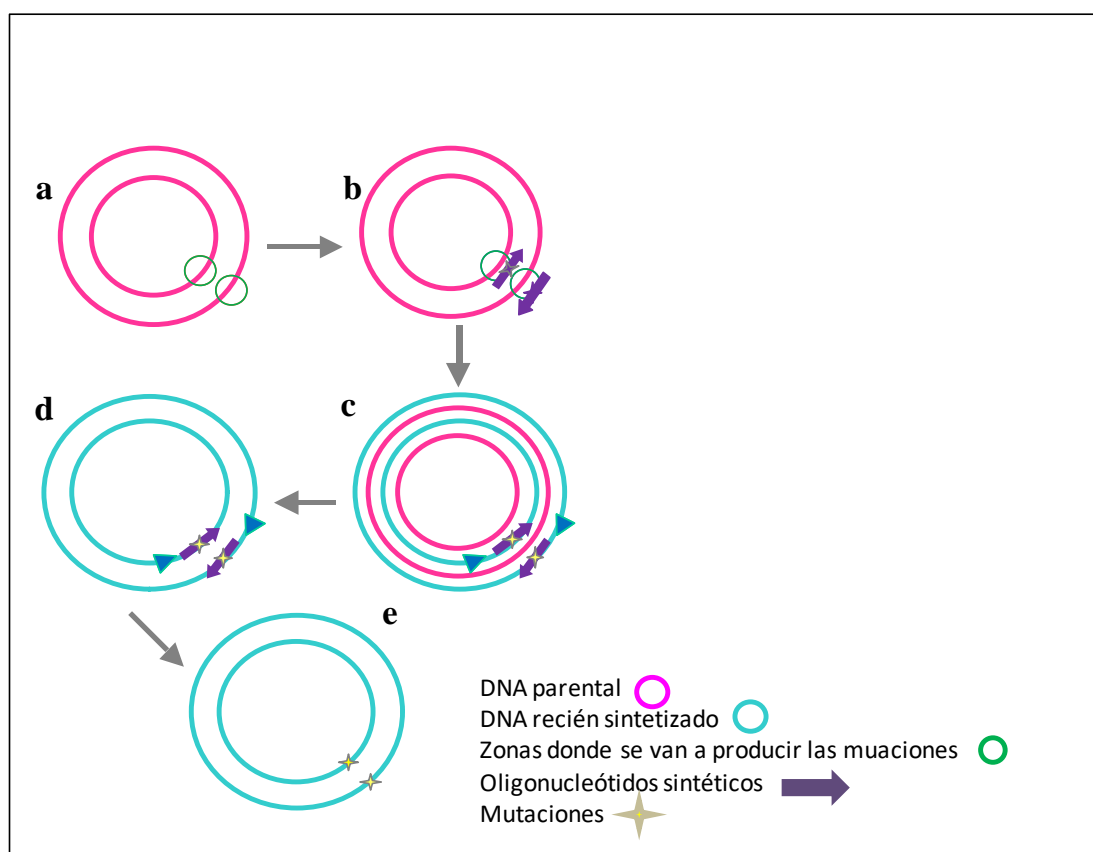


Figura II.3: Esquema de la construcción de clones con el sistema de mutagénesis dirigida. a) El DNA molde de doble cadena contiene el gen que codifica la proteína a mutar b) En la reacción de PCR, el DNA molde se desnatura e hibrida con los oligonucleótidos que contienen las mutaciones. c) La polimerasa extiende las cadenas recién sintetizadas utilizando los oligonucleótidos sintéticos como cebadores. d) El DNA parental se digiere por la DpnI. e) La transformación con células ultracompetentes con el DNA recién sintetizado provoca el cierre de las mechas en los extremos de sus cadenas simples y permite seleccionar los clones positivos.

Para generar los mutantes en las diferentes regiones del C2AB de Rabfilina 3A se han empleado los oligonucleótidos que aparecen en la tabla II.1.

Tabla II.1: Construcciones mutantes en el dominio C2AB de rabfilina 3A y sus oligonucleótidos.

MUTANTE	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD	OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE
E492Q	5'GACAAATTTGGCCACAATCAGTT TATT	5'TCTGGTCTCACCAATAAACTGAA TGTG
D429N	5'GATTCAAACGGCTTGCTAACCC CTAC	5'GAGGTGCAGCTTAACGTAGGGGT TAG
D484N/D486N	5'CTCAGGATCTCCGTCTGTAAACGA GAAC	5'AAATTCATTGTGGCCAAATTTGTT CTC
D641N/D643N	5'TCACTGGACATTTCACTCTGGAA CTAT	5'GTAATCATTGGACTTGCCGATGTT ATA
E539A/E540A	5'CGAGGCATGGCCCTTATGAGGC CGC	5'GATGTCACCAACACGCTCCACCT GGG
R524A	5'GAGCGAGTGATTCCTATGAAAGC CGC	5'TCGGGCTGACCCGGTGGTCCCAG CGG
K532A	5'GCTGGGACCACCGGGTGAGCCGG	5'TTCTCATAAAGGGCCATGCCGG CGG
K544A	5'TATGAGGAAGAGCAGGTGGAGG CCGT	5'GCCACGCTCCTCGATGTCACCAA CGG
K666A/K673A/ K675A	5'GCCAAGGGAGAGCGCTTAGCCCA CTG	5'GCGCTCTATCTTCTTGTCGGCATT GGC

Para el caso del SNAP25 se hicieron mutantes a partir del molde YFP-SNAP25. Los residuos mutados se muestran en la siguiente tabla II.2

Tabla II.2: Construcciones mutantes en el SNAP25.

RESIDUOS MUTADOS	OLIGONUCLEOTIDOS FORWARD	OLIGONUCLEOTIDOS REVERSE
R9A/E10A/Q15A	5'CAGCCCTTCGGGCCATCTCCTCCA GGCATTGGCCACCTCGAGCAGCAT	5'ATGCTCGAGGTGGCCAATGCCCTG GAGGAGATGGCCCGAAGGGCTG
E38A/D41A/R45A	5'CGCAGACATGGCCGCCGAGCTGG AGGAGATGGCCCGAAGGGCTG	5'CAGCCCTTCGGGCCATCTCCTCCA GCTCGGCGGCCATGTCTGCG
I44A/V48A	5'AGTAAAGATGCTGGTGCCAGGAC TTGGCCATGTTGGATGAAC	5'GTTCATCCAACATGGCCAAAGTCC TGGCACCAGCATCTTTACT
D51A/E55A/R59A	5'TTCTTCGACGGCATCGAGTTGGGC TCCTTGTTGGCCCAACATAAC	5'GTTGCCCAACTCGATGCCGTCGAA GAAATGTTGGCCGAACAAGGA
**E38A/D41A/R45A/D51A/ E55/R59-A	5'TTCTTCGACGGCATCGAGTTGGGC TCCTTGTTGGCCCAACATAAC	5'GTTGCCCAACTCGATGCCGTCGAA GAAATGTTGGCCGAACAAGGA

**Para el mutante E38A/D41A/R45A/D51A/E55A/R59A se usó como molde el mutante obtenido a partir del DNA molde YFP-SNAP25 mutado en los residuos E38A/D41A/R45A.

1.8.-OBTENCIÓN DE CLONES DE STX1A y VAMP2.

El DNA codificante de las secuencias de Sintaxina1A (STX1A) y VAMP2 fueron obtenidos a partir de Addgene (Cambridge, MA, USA). STX1A (A191-K256) y VAMP2 (S28-W89) fueron expresados de manera recombinante en *E.coli*. Los genes de estas proteínas fueron aislados y amplificados a partir de un plásmido preexistente mediante reacción de PCR. El inserto fue clonado en pET15b. Los plásmidos fueron transformados en células ultracompetentes DH10B de *E.coli*.

Para llevar a cabo una digestión de DNA de doble cadena éste se incubó con los enzimas de restricción adecuados. Se digiere con dos enzimas a la vez (doble digestión). En el caso de pET15b fue incubado con NdeI y XhoI.

Tabla II.3: Construcciones de Sintaxina 1A y VAMP2 en pET15b.

CONSTRUCCIÓN	OLIGONUCLEÓTIDO FORWARD	OLIGONUCLEÓTIDO REVERSE
Sintaxina 1-A	5'CGCGGCAGCCATATGGCCCT CAGTGAGATCGG	5'AGCCGGATCCTCGAGTTACTT GACGGCCTTCTTG
VAMP2	5'CGCGGCAGCCATATGAGTAA CAGGAGACTGCAG	5'AGCCGGATCCTCGAGTTACTT GAGGTTTTTCCA

2.-MÉTODOS BIOQUÍMICOS.

2.1.-ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA con DODECILSULFATO SÓDICO. SDS-PAGE.

La electroforesis de proteínas SDS-PAGE es una de las técnicas más empleadas para la separación de proteínas. Se trata de un método práctico, rápido y económico a nivel de muestra puesto que se necesitan cantidades de proteínas en el orden de microgramos para su identificación.

El sistema utilizado para la electroforesis en esta Tesis Doctoral fue el Mini-Protean III de BioRadLaboratories, CA, Estados Unidos, siguiendo el método desarrollado por Lamneli en 1970. El sistema está compuesto por una fuente de

tensión que genera un campo eléctrico mediante dos electrodos, uno positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) creándose entre ellos una diferencia de potencial. Una cubeta en cuyos extremos se sitúan los electrodos y dentro de la cubeta se coloca el soporte electroforético con el o los geles de poliacrilamida. Se utiliza un tampón de electroforesis que es necesario puesto que durante el proceso de electroforesis tiene lugar la electrolisis del agua lo que da lugar a protones en la proximidad del ánodo e iones hidroxilo en la proximidad del cátodo, de manera que el tampón evitará que el entorno anódico se acidifique y el catódico se basifique a lo largo del proceso de electroforesis.

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se prepararon geles entre 15% (p/v) y 17% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida dependiendo del tamaño de las proteínas de estudio. En primer lugar se formó el gel separador, donde las muestras se separan en función de su carga y tamaño. La mezcla de acrilamida-bisacrilamida fue disuelta en tampón 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.2% (w/v) SDS. Para polimerizar el gel separador se añadió persulfato amónico (PSA) 0.064% (p/v) y TEMED 0.064% (v/v). Una vez polimerizado el gel separador se añadió el gel concentrador que consigue que todas las proteínas entren al mismo tiempo en el gel separador. El gel concentrador o *stacking* se prepara al 5% de acrilamida en 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.2% (w/v) SDS. Los geles polimerizaron con la adición de PSA 0.064% y TEMED 0.064%. El *buffer* o tampón de electroforesis está compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM y 0.1% (p/v) SDS. Las muestras se prepararon añadiendo 5x buffer de Laemmli (0.25 M Tris pH 6.8, 10% (w/v) SDS, 50% glicerol, 0.5 M DTT, 0.25% Bromophenol Blue), posteriormente fueron hervidas a 90°C durante 5 minutos para asegurar su completa desnaturalización. Se cargaron y separaron a 100V a través de su paso por el gel concentrador y luego el voltaje fue incrementado hasta 150V en el gel separador. Para determinar el peso molecular de las proteínas se utilizó una mezcla de marcadores pre-teñidos formado por proteínas patrón de peso molecular conocido. Durante este trabajo se empleó el marcador *Page Ruler™ Plus Prestained* (Thermo Fisher Scientific, Madrid, España), que contiene una mezcla de nueve proteínas teñidas de azul, naranja y verde y cuyos pesos moleculares varían de 10 a 250 kDa.

2.2.- TINCIÓN DE GELES CON COOMASSIE.

Los geles resultantes de la electroforesis se incubaron en una disolución de azul de Coomassie Brilliant Blue G-250 0.25% (w/v) en metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) durante 20-30 minutos. La solución del Coomassie Brilliant Blue G250 fue filtrada previamente con papel Whatman n°2. A continuación fueron desteñidos con una disolución de metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v) para visualizar las bandas de las proteínas.

2.3.-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.

2.3.1.-Espectrofotometría UV. Absorbancia a 280nm.

La concentración de proteína se calculó midiendo la absorbancia de la muestra a 280 nm en un espectrofotómetro (Nano Photometer bio Nova, Schatzbogen, Germany). La mayor parte de las proteínas poseen un pico de absorción máxima a 280 nm siendo los grupos responsables de tal característica los aminoácidos aromáticos Tirosina (λ_{\max} 275 nm) y Triptófano (λ_{\max} 278 nm y 287nm). El aminoácido fenilalanina (λ_{\max} 258 nm) y los puentes disulfuro también pueden contribuir a la absorción en esa longitud de onda, aunque mucho menos. Se trata de un método simple que requiere un volumen pequeño de muestra. Es importante que la muestra esté lo suficientemente pura y que no tenga componentes no proteicos con el mismo espectro de absorción como puede ocurrir con los ácidos nucleicos. En este sistema de medida se debe conocer la secuencia exacta de aminoácidos de la proteína y el coeficiente de extinción molar de la proteína (E_{280}) y mediante la Ley de Lambert-Beer es posible estimar la concentración de proteína.

$$\text{Grosor cubeta (cm}^{-1}\text{)} * \text{Abs}_{280\text{nm}} * E_{280}(\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}) = C$$

2.3.2.- Espectroscopia de Infrarrojo (IR).

La técnica de espectroscopia de Infrarrojo (IR) se empleó para determinar la concentración de proteínas que carecían de aminoácidos aromáticos y de mezclas proteicas en las que no se podía determinar la concentración de proteína en base a la absorbancia a 280 nm.

Se trata de una potente herramienta para la detección y análisis de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos basada en la capacidad que tienen las moléculas de absorber radiación a frecuencias específicas características de su estructura.

La estructura primaria de las proteínas está formada por una larga cadena de enlaces tipo amida. Cada enlace amida a su vez está formado por subestructuras químicas capaces de absorber la radiación IR en nueve áreas del espectro. Para determinar la concentración de proteína, el sistema *Direct Detect*TM (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania), calcula la intensidad de Amida I y Amida II. La absorción Amida I consiste principalmente en una vibración de estiramiento C=O (alrededor del 80%) con una contribución menor de la vibración de estiramiento C-N (20%) mientras que para la Amida II está dividida entre la flexión N-H (60%) y C-N (40%).

Se empleó una membrana hidrofílica de politetrafluoroetileno (PTFE) diseñada para la aplicación y retención de las muestras. El tamaño de aplicación de la muestra es ligeramente más pequeño que el haz de IR asegurando así un sondeo de toda la muestra. Se requiere un volumen de 2 µl para la medición.

La cuantificación de proteínas por este método no está sujeta a la interferencia de señal de componentes habituales en las preparaciones como tampones biológicos, detergentes o agentes reductores entre otros.

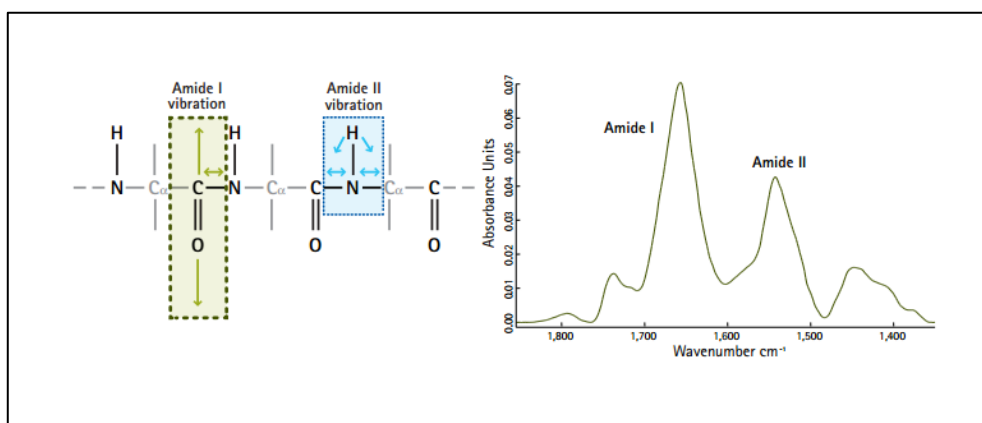


Figura II.3: Imagen tomada de *DirectDetect*TM Representación de los enlaces Amida I y Amida II.

2.4- CROMATOGRAFÍA.

Se trata de una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla. El método se fundamenta en poner en contacto dos fases mutuamente inmiscibles que no reaccionan químicamente. Una de las fases es móvil y la otra estacionaria. La mezcla a separar se deposita en la fase estacionaria, mientras que la fase móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla. A medida que la fase móvil pasa a través de la fase estacionaria se produce una absorción selectiva, de manera que aquellos componentes de la fase móvil que muestran mayor afinidad de absorción con la fase estacionaria quedarán retenidos en las capas superiores de la columna y aquellos que muestran una menor afinidad quedarán retenidos en las capas inferiores. Como consecuencia de esta diferente movilidad se consigue separar los componentes de la mezcla en bandas o zonas discretas que pueden analizarse de manera cualitativa y/o cuantitativa. El fenómeno de la migración de los componentes de la mezcla a lo largo de la fase estacionaria recibe el nombre de elución y el tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y es una propiedad identificativa y característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. Dependiendo del tipo de cromatografía, la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido, mientras que la fase móvil puede ser un líquido o

un gas. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral hemos empleado las siguientes técnicas cromatográficas.

2.4.1-Cromatografía de afinidad de unión a metal (IMAC).

Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de unión a metales divalentes que tienen algunos aminoácidos, principalmente cisteína e histidina que están expuestos en la superficie de la proteína. En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se emplearon columnas HisGraviTrap (GE Healthcare) cargadas con iones Ni^{2+} .

2.4.2-Cromatografía de filtración en gel.

Este tipo de cromatografía también denominada de exclusión molecular o de tamiz molecular es una de las técnicas más utilizadas para la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Las columnas que se emplean para llevar a cabo este tipo de cromatografía están rellenas de un gel, que constituye la fase estacionaria y que puede ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharosa), poliacrilamida, etc. Formando una matriz hidratada de poro de diámetro determinado. De manera que cuando se pasa la mezcla de moléculas con un tamaño superior al de los poros de las partículas que constituyen la matriz, estas se mueven a lo largo de la fase estacionaria a través de los espacios que quedan entre las partículas de la matriz y aquellas que son capaces de penetrar en los poros se verán retrasadas por la fase estacionaria en mayor medida cuanto menor sea su tamaño. De este modo, las moléculas se eluyen de forma inversa a su tamaño molecular.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se recurrió a la técnica de cromatografía de filtración en gel y se han empleado las siguientes columnas HP26/10 (GE Healthcare), HiLoad 16/60 S75 (GE HealthcareEurope) y Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare).

2.5.-PREPARACIÓN DE MEZCLAS LIPÍDICAS.

Los lípidos usados se adquirieron en la compañía Avanti Polar Lipids, Alabama, Estados Unidos. Las diferentes mezclas lipídicas se prepararon disolviendo los diferentes lípidos liofilizados en cloroformo:metanol (2:1). Se emplearon 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3 fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfoserina (POPS), 1- α -phosphatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂). Se prepararon mezclas compuestas por POPC/POPS (75:25) y POPC/POPS/PIP₂ (65:25:10). Estas mezclas fueron secadas con nitrógeno gaseoso y fueron mantenidas bajo atmósfera de vacío durante aproximadamente 3 horas hasta conseguir que todos los solventes orgánicos evaporaran. Los lípidos secos fueron resuspendidos por encima de la temperatura de transición durante 30-60 minutos.

2.5.1.- Vesículas multilamelares (MLV).

Una vez preparada la mezcla lipídica, ésta fue resuspendida en el tampón correspondiente mediante agitación fuerte e incubación a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase durante unos 15 minutos. De esta forma se constituyeron las vesículas multilamelares.

2.5.2.- Vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

Partiendo de vesículas multilamelares (MLV), la mezcla se sometió a ultrasonidos utilizando un sonicador de tipo punta (Cole-Parmer Instrument, Co. Chicago) hasta conseguir una mezcla clara. Posteriormente las mezclas fueron sometidas a una centrifugación durante 5 minutos a 26000xg para separar las posibles MLV que quedasen y eliminar las partículas de titanio desprendidas del sonicador.

2.6.-DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LÍPIDOS.

Para determinar la concentración de fosfolípido se empleó el método descrito por *Bötcher y col. (1961)*, basado en la hidrólisis de la mezcla fosfolípida para

medir la concentración de fosfato inorgánico liberado (Pi), el cual aparece en proporción estequiometría 1:1 con respecto a cada molécula de fosfolípido, a excepción del fosfoinosítido PIP₂ que presenta una estequiometría 1:3.

Consiste en hacer una recta patrón de Pi a partir de una disolución estándar de Na₂HPO₄ 0.4 mM, a diferentes concentraciones, 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 160 nmoles a cada tubo. En los tubos problemas se añadieron entre 60-80 nmoles aproximadamente. A continuación, a cada tubo se añadió 0.4 ml de HClO₄ al 60% (v/v) y la mezcla se incubó a 180°C en un termobloque. Posteriormente a cada tubo se le añadieron 4 ml de reactivo de molibdato, que contenía 2.2 gr de (NH₄)₄Mo₇O₂₄·4H₂O (Merck) y 4.3 ml de H₂SO₄ concentrado por litro de disolución. Finalmente, en agitación a cada tubo se le añadió 0.5 ml de ácido ascórbico al 10% (p/v) (Merck) y las muestras fueron incubadas a 100°C en un baño de agua durante 10 minutos y finalmente se dejaron enfriar y se midió su absorbancia a 812 nm.

3.-EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Para abordar las técnicas bioquímicas y de cristalografía de rayos X que se desarrollan en esta Tesis Doctoral fue necesario conseguir elevadas cantidades de proteína, con un alto grado de pureza (>95% evaluada mediante SDS-PAGE teñido con azul Comassie) y que la muestra fuese homogénea. Para conseguir una muestra que cumpliera con estos criterios se emplearon técnicas como la cromatografía de afinidad y de exclusión de tamaño. La preparación de estas muestras conlleva una serie de etapas. Una primera fase denominada preparativa en la que se realiza la purificación, en esta fase se emplea la cromatografía de afinidad, donde se elimina la mayor parte del extracto crudo celular de la lisis, y se separa y concentra la proteína a estudiar. Según la pureza obtenida se suele incluir una segunda etapa de purificación mediante cromatografía por exclusión de tamaño, se trata de una etapa de pulido en la que nos aseguramos la homogeneidad y la pureza de la muestra.

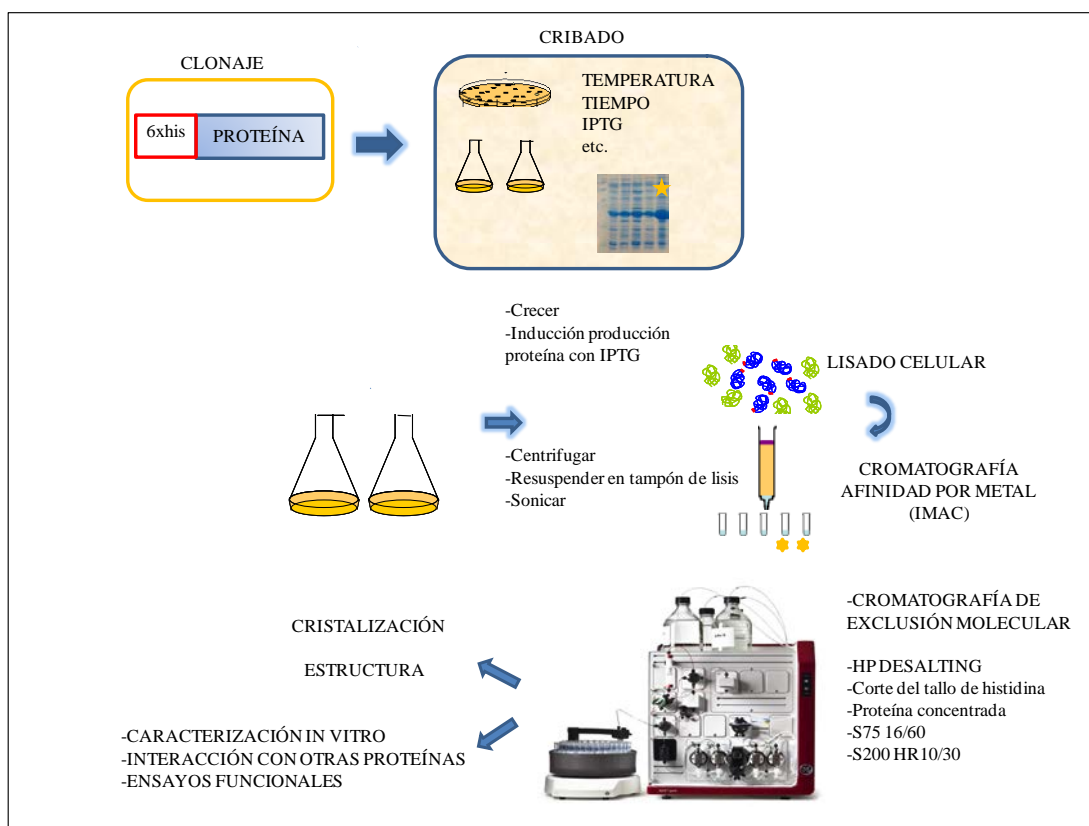


Figura II.4: Esquema general del proceso de producción de una Proteína Recombinante. Estrategia de clonaje-cribado de expresión (optimización de las condiciones de producción)-Escalado-Proceso de Purificación-Pulido de la muestra.

3.1.-EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE RABFILINA 3A Y SUS MUTANTES.

La expresión de proteínas se hizo en matraces tipo Erlenmeyer de 2 litros con 500 ml de LB con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$). 10 ml del cultivo crecido durante toda la noche (aproximadamente 16 horas) fue inoculado en el matraz con 500 ml de LB y el antibiótico adecuado, que fue incubado a 37°C en agitación (170-180 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (O.D_{600}) de 0.6-0.8 y en este punto se produce la inducción con 0.5 mM IPTG y se dejó durante aproximadamente 6 horas en una incubadora a 30°C con agitación de 130-140 rpm. Posteriormente las bacterias se recogieron mediante centrifugación a 10000xg durante 30 minutos a 4°C.

Para el proceso de purificación, los pellets fueron lisados por sonicación en buffer de lisis (25 mM Hepes pH 7.4 300 mM NaCl) con inhibidores de proteasas

(10 mM benzamidina, 1 mM PMSF y 10 µg/ml de inhibidor de tripsina). La fracción soluble del lisado fue separada a través de columnas HisGraviTrap (GE Healthcare). La columna fue pre-equilibrada con *buffer* de lisis que contenía 20 mM Imidazol. Tras pasar todo el lisado a través de la columna la fracción unida en la columna fue eluida con un gradiente de imidazol de 50 mM a 500 mM. Se recogieron fracciones de 1 ml y se recolectaron aquellas donde aparecía la proteína de interés. El imidazol se intercambió en una columna HP26/10 (GE Healthcare) acoplada a un sistema ÄKTA FPLC® previamente equilibrada con 25 mM Hepes pH 7.4 300 mM NaCl. Se recogieron las fracciones que contenían la proteína de interés y se sometieron a digestión con trombina para eliminar el tallo de 6xhistidinas. Se realizó una incubación durante 90 minutos a 18°C. Posteriormente la mezcla se incubó con resina de p-aminobenzamidina durante 30 minutos a 4°C. Tras desechar la resina y los restos de los tallos por centrifugación, la proteína se concentró usando filtros ultrafree 10 (Millipore Inc., Bedford, MA) hasta 0.5 ml para proceder a la última etapa del proceso de purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna HiLoad 16/60 S75 (GE Healthcare) pre-equilibrada con 25 mM Hepes pH 7.4 100 mM NaCl. Las fracciones recogidas fueron chequeadas en un gel de poliacrilamida y aquellas que estaban puras fueron juntadas y concentradas usando el mismo tipo de filtro antes descrito hasta la concentración adecuada. Se estimó la cantidad de proteína empleando el espectrofotómetro y las proteínas fueron guardadas en alícuotas pequeñas a -80°C.

Para la obtención de los mutantes de C2AB de rabfilina 3A se usó como molde el dominio en tándem C2AB-Rph3A y se siguió el protocolo de mutagénesis dirigida (Quickchange XL site directed mutagenesis, Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) para sustituir puntualmente los residuos. Estos mutantes fueron enviados a secuenciar al Servicio de Biología Molecular de la Universidad de Murcia (SAI).

La purificación de los mutantes para el tándem C2AB de rabfilina 3A se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo que para la estirpe silvestre.

3.2.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE SNAP25A.

Para expresar estas proteínas se emplearon las células ultracompetentes BL21 (DE3) de *E.coli*. De las colonias obtenidas tras la transformación bacteriana se inculó una de las colonias en un cultivo toda la noche a 37°C en agitación con 10 ml de LB con kanamicina (50 µg/ml) para el caso de SNAP25-N y SNAP25-C y con ampicilina (100 µg/ml) para SNAP25 completo. A la mañana siguiente el cultivo se sembró en 500 ml de medio de cultivo y el antibiótico adecuado para cada construcción. Se dejó crecer en agitación (170-180 rpm) a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6-0.8 unidades de absorbancia a 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica se indujo la producción de proteína con isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich), a una concentración de 0.5 mM y se mantuvo en agitación (130-140 rpm) durante 5 horas a 25°C. Pasado este tiempo el contenido de los matraces se recolectó mediante centrifugación a 10000xg durante 30 minutos a 4°C.

Las construcciones SNAP25-N y SNAP25-C fueron resuspendidos en tampón de lisis (25 mM Hepes pH 7.4, 140 mM NaCl, 0.125 mM DTT) con inhibidores de proteasas (10 mM benzamidina, 1 mM PMSF y 10 µg/ml de inhibidor de tripsina) mientras que el SNAP25 completo fue resuspendido en tampón de lisis (25 mM Tris pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 mM DTT) con inhibidores de proteasas (10 mM benzamidina, 1 mM PMSF y 10 µg/ml de inhibidor de tripsina).

Las células se lisaron mediante ultrasonidos (10 ciclos x 10 segundos) y la suspensión se centrifugó a 20000xg. La proteína de interés disuelta en el sobrenadante se purificó a través de una columna HisGraviTrap (GE Healthcare), esta columna fue previamente equilibrada con tampón de lisis que contenía 20 mM de imidazol. Una vez pasado todo el sobrenadante por la columna, la fracción unida fue eluida con un gradiente de imidazol de 50 a 500 mM de imidazol y recogida en fracciones de 1 ml.

Las fracciones con proteína pura se recolectaron y el imidazol se intercambió en una columna HP26/10 Desalting (GEHealthcare) acoplada al sistema FPLC

ÄKTA[®]Pure previamente equilibrada con tampón 25 mM Hepes pH7.4 140 mM NaCl 0.125 mM DTT para el caso de las construcciones -N y -C y 25 mM Tris pH 7.4 100 mM NaCl 1 mM DTT para SNAP25 completo. Las fracciones que contenían la proteína de interés se recogieron y se incubaron con trombina a 0.01U/μg durante 1 hora a 18°C para cortar el tallo de 6 histidinas. A continuación, la disolución se incubó durante 60 minutos a 4°C con 50 μl de resina de p-aminobenzamidina (Sigma), para eliminar la trombina. Tras desechar la resina y los tallos de histidina por centrifugación, la proteína fue concentrada con filtros Ultrafree-10K (Millipore Inc., Bedford, MA) hasta 2 ml para pasarla a través de la columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) previamente pre-equilibrada con 25 mM Hepes pH 7.4 100 mM, 0.125 mM DTT y 25 mM Tris pH7.4 100 mM NaCl, 1 mM DTT.

3.3.- EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE STX1A Y VAMP2.

Para expresar las proteínas de fusión 6xhistidina STX1A y VAMP2 se emplearon las células ultracompetentes BL21(DE3) de *E.coli*. De las colonias obtenidas tras la transformación bacteriana se inoculó una de las colonias en un cultivo de 10 ml de LB con ampicilina 100 μg/ml y se incubó en agitación durante 16 horas a 37°C en agitación. A la mañana este pre-inóculo se empleó para inocular un cultivo de 500 ml con ampicilina que se incubó en agitación a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0.6-0.8 unidades de absorbancia medida a 600 nm. A continuación se indujo con isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG), a una concentración de 0.5 mM y se mantuvo en agitación durante 5 horas a 25°C para expresar proteínas. Transcurrido este tiempo las bacterias se sometieron a centrifugación, 10000xg durante 30 minutos a 4°C.

El precipitado celular fue resuspendido en tampón de lisis (25 mM Tris pH 7.4 300 mM NaCl 1 mM DTT) con inhibidores de proteasas (10 mM benzamidina, 1 mM PMSF y 10 μg/ml de inhibidor de tripsina).

Las células se lisaron mediante ultrasonidos (10 ciclos x 10segundos) y la suspensión se volvió a centrifugar a 20000xg, 30 minutos, a 4°C. El uso del

Materiales y Métodos

sonicador en el proceso de purificación permite optimizar la extracción de la proteína. Tras la centrifugación se recuperó el sobrenadante que contenía la proteína de interés y se incubó en una columna HisGraviTrap (GE Healthcare). Previamente la columna fue equilibrada con tampón de lisis que contenía 20 mM Imidazol. Tras pasar todo el lisado a través de la columna, la fracción unida fue eluida con un gradiente de imidazol de 50 mM a 500 mM en fracciones de 1 ml.

Las fracciones con proteína pura se mezclaron y el imidazol se intercambió en una columna HP26/10 Desalting (GEHealthcare) acoplada al sistema FPLC ÄKTA[®] pure previamente equilibrada con tampón 25 mM Tris pH7.4 100 mM NaCl 1 mM DTT. Las fracciones con proteína pura se mezclaron e incubaron con trombinadurante 1 hora a 18°C para eliminar el tallo de 6 histidinas. A continuación, la disolución se incubó durante 60 minutos a 4°C con 50 µl de resina de p-aminobenzamidina (Sigma), para eliminar la trombina. Tras desechar la resina y los tallos de histidina por centrifugación, la proteína fue concentrada con filtros Ultrafree-10K (Millipore Inc., Bedford, MA) hasta 0.5 ml para terminar de eliminar las impurezas mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) previamente pre-equilibrada con 25 mM Tris pH 7.4 100 mM, 1 mM DTT.

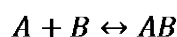
4.-TÉCNICAS.

4.1.-CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC).

La Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) es una poderosa herramienta que nos permite la determinación de los parámetros termodinámicos de unión de una reacción. Con esta técnica se consiguen medir los cambios de calor asociados cuándo se produce una unión entre un ligando y una macromolécula de interés a temperatura constante. Los cambios de calor observados son entonces ajustados matemáticamente para determinar las propiedades termodinámicas de la interacción. El calorímetro consiste en una camisa adiabática con dos celdas, llamadas celda de referencia y celda de muestra. La camisa adiabática asegura que no haya ganancia o pérdida de

energía neta en el sistema, de modo que cualquier energía medida es consecuencia de la reacción química. La celda de referencia contiene agua y la celda de referencia la macromolécula de estudio. El ligando se inyecta con una jeringa de precisión de forma automatizada mediante un motor controlado por el equipo informático. El ligando suele estar entre 4-20 más concentrado que la macromolécula (dependiendo de la afinidad entre ligando y macromolécula) y es adicionado de manera controlada y en agitación en la celda donde está la macromolécula. Durante la inyección de ligando en la celda donde está la macromolécula en solución, el calor liberado o absorbido es medido respecto a la celda de referencia (llena de agua). El cambio calorífico se expresa en forma de capacidad eléctrica ($\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$) necesaria para mantener una diferencia de temperatura pequeña y constante entre la celda de referencia y la celda que contiene la muestra. Si el efecto térmico y la magnitud de la constante de unión son los suficientemente grandes se pueden determinar parámetros tales como la constante de equilibrio de asociación, K_a , el cambio de entalpía de unión, ΔH , así como la estequiometría de la reacción, N . A partir de estos datos se pueden calcular la energía de Gibbs (ΔG) y la entropía (ΔS) de formación del complejo. Además, si se realizan los experimentos a diferentes temperaturas es posible determinar el cambio en la capacidad calorífica del proceso, ΔC_p .

Los parámetros termodinámicos se basan en reacciones en equilibrio y las relaciones termodinámicas.



$$K_a = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$$\Delta G^0 = RT \ln K_{eq}$$

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

La señal eléctrica que observamos es la diferencia de energía entre ambas celdas. En los procesos endotérmicos, cuando la reacción química absorbe energía, la diferencia de energía aumenta hasta que la temperatura en la celda de referencia y de

la muestra se equiparan. En las reacciones exotérmicas el calor liberado en el proceso es compensado por la celda. Este cambio en la señal eléctrica se muestra en los datos crudos y depende de la concentración de la macromolécula. Cuando la unión entre el ligando y la macromolécula se satura, no se observa calor liberado o absorbido. En este punto podemos observar picos que representan el calor propio de la inyección.

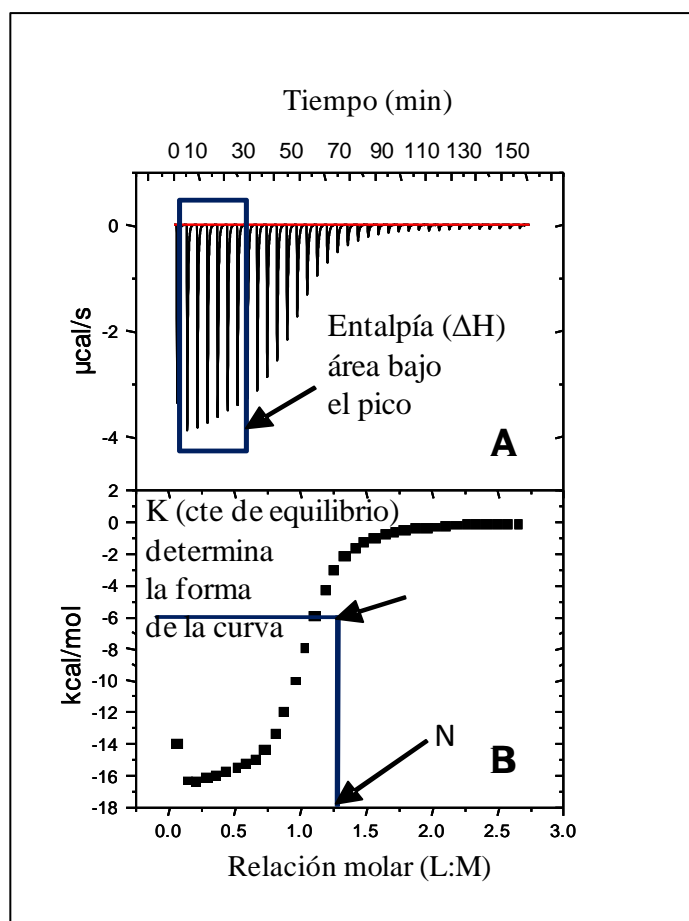


Figura II.5: Representación típica de un experimento de titulación de una reacción exotérmica. Sobre estos datos se utiliza el modelo de ajuste a los modelos teóricos utilizando el programa Origin 5.0 (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, EEUU).

Esta figura muestra los datos crudos obtenidos de un experimento de ITC. Cada pico corresponde al calor liberado debido a las diferentes inyecciones de ligando. La integración de la señal eléctrica respecto al tiempo proporciona el cambio calorífico aparente, $\Delta q_{i, \text{ap}}$, entre las inyecciones $i-1$ e i , y se corresponde con el área bajo el pico i , $\Delta q_{i, \text{ap}} = q_i - q_{i-1}$. Conforme la fracción de sitios saturados aumenta, los calores observados van descendiendo de modo gradual. Finalmente, todos los sitios

se encuentran saturados y se observan pequeños calores detectados debidos al calor de dilución del ligando en el tampón y a otros efectos no específicos.

Los datos se suelen representar de modo diferencial, mostrando el calor total normalizado frente a la relación molar de la concentración entre el ligando y la macromolécula. Esto da lugar a una típica curva de saturación sigmoideal. Ambos, la variación de calor por mol, ΔH_{ap} , así como el número de sitios de unión, N, pueden ser obtenidos a partir de esta representación. Ambos parámetros están relacionados y el éxito en la deconvolución de la gráfica del ITC depende de la información adicional independiente sobre el número de sitios de unión.

El análisis de los datos se realiza con un programa informático (Origin, MicroCal Software Inc., Northampton, MA, EEUU). Con este programa se ajustan los datos experimentales a diferentes modelos de unión teóricos, 1) *el modelo de unión a un solo tipo de sitio*, 2) *modelo de unión a dos tipos de sitios*, 3) *modelo de unión tipo secuencial*.

4.1.1.-Ecuaciones utilizadas para el ajuste de los datos de ITC.

4.1.1.1- Modelo de unión a un tipo único de sitios idénticos.

Este modelo asume que uno o más ligandos son capaces de unirse con una afinidad similar a un sólo sito de unión. El calor liberado o absorbido (Q) dado un volumen, V_0 para este modelo se describe:

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

Donde:

n = número de sitios de unión

M_t = concentración total de la macromolécula

X_t = concentración total del ligando

ΔH = calor molar de la unión del ligando

K = constante de unión

El volumen en la celda de la muestra no es constante y al final de la titulación, el volumen está alterado V_i y esta diferencia en el volumen contribuye al calor liberado. La expresión correcta para el calor liberado:

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

Estos resultados muestran que la estequiometría (n), la constante de unión (K) y el calor molar de la unión del ligando (ΔH) puede ser determinados inicialmente por la cantidad de calor liberado o absorbido en cada inyección y permite mejorar los valores de n , K , ΔH , mediante los métodos estándar tipo Marquardt. Después de obtener estos valores, una tercera ecuación puede ser usada para determinar la entropía (ΔS) y la energía libre de Gibbs (ΔG) de la reacción:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S$$

4.1.1.2.- Modelo de unión a dos tipos de sitios independientes.

Según este modelo existe más de un sitio de unión y se trata de sitios independientes, de manera que la unión a un sitio no determina la unión a otro. Utilizando la misma definición de símbolos que en el caso anterior, tenemos las constantes de unión, K_1 y K_2 . Después de una corrección similar a la realizada en el caso anterior para el volumen desplazado, el efecto del calor calculado para la inyección i es

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

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

4.1.1.3.-Modelo de unión a sitios secuenciales.

Según este modelo hay varios sitios de unión y la unión a un sitio influye en la capacidad de unión a otro. Para la unión según un modelo secuencial, las constantes de unión K_1, K_2, K_n deben definirse en relación al proceso de saturación, de forma que

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

En el modelo secuencial, no hay distinción en cuánto a qué sitios están saturados, sino sólo si el número total de sitios está saturado. Si los sitios son idénticos hay entonces una degeneración estadística asociada a la saturación secuencial, ya que el primer ligando en unirse tiene más sitios vacíos del mismo tipo para elegir que los que tiene el segundo ligando y así sucesivamente. Para sitios idénticos que interaccionan podemos distinguir entre las constantes de unión fenomenológicas K_i y las constantes de unión intrínsecas K_i^0 donde no existe el efecto de estas degeneraciones. La relación entre ambos tipos de constantes viene dada por:

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} K_i^0$$

$$K_1 = \frac{[MX]}{[M][X]}$$

Materiales y Métodos

Todos los cálculos definidos, así como los parámetros obtenidos del ajuste, se encuentran definidos en términos de K_i y se pueden obtener los valores de K_i^0 utilizando la ecuación anterior.

Las concentraciones de todas las especies ligadas pueden ser expresadas en términos de concentración de las especies no ligadas, entonces la fracción de la macromolécula total con i ligandos unidos, F_i , es como sigue:

$$F_0 = \frac{I}{P}$$

$$F_1 = \frac{K_1[X]}{P} \quad F_2 = \frac{K_1K_2[X]^2}{P} \quad \dots \quad F_n = \frac{K_1K_2\dots K_n[X]^n}{P}$$

$$P = 1 + K_1[X] + K_1K_2[X]^2 + \dots + K_1K_2\dots K_n[X]^n$$

$$X_t = [X] + M_t \sum_{i=1}^n i F_i$$

Una vez que n y los parámetros de ajuste K_1 a K_n están definidos se pueden resolver las ecuaciones anteriores con el método de la bisección que utiliza el programa Origin (MicroCal Software Inc., Northampton, MA EEUU).

Conocido $[X]$, todos los F_i se pueden calcular a partir de la ecuación y el contenido de calor después de la inyección i queda determinado como

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

Y como antes,

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

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) fue empleada para investigaciones previas de la capacidad de unión de calcio a los dominios C2 en las proteínas quinasas C (PKC) en sus isoformas (α , β , γ) (Torrecillas *et al.*, 2004) y en las isoformas de la fosfolipasa D (Zheng *et al.*, 2000). Los ensayos desarrollados en este trabajo están basados en estos estudios previos.

Se estudiaron y caracterizaron las propiedades termodinámicas de la unión de los dominios C2 aislados y al tándem C2AB de rabfilina 3A a lípidos y Ca^{2+} mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), utilizando un microcalorímetro Microcal modelo MCS (Microcal Inc., Northampton, MA, EEUU). (Wiseman, Williston, Brandts, & Lin, 1989) Wiseman *y col.* describieron con detalle este equipo así como su utilización. Los resultados obtenidos se ajustaron a varios modelos teóricos de interacción que proporciona el programa Origin 5.0, Microcal Software Inc., Northampton, MA, EEUU).

Los experimentos de esta Tesis Doctoral fueron llevados a cabo a 25°C. El buffer empleado fue 25 mM HEPES pH 7.4 100 mM NaCl tratado con chelex. La celda de referencia contenía agua destilada y desionizada calidad MiliQ.

En el caso de los experimentos de unión de calcio a los dominios C2AB. Se cargó una disolución de CaCl_2 en una jeringa de 500 μl y se añadió a la muestra en 54 inyecciones de 5 μl cada una, con una velocidad de inyección de 1 $\mu\text{l}/\text{seg}$ y una agitación de 260 rpm, dejando un intervalo de 300 segundos entre cada titulación. La concentración de proteína y calcio fue de 274 μM (10 mg/ml) y 14 mM, respectivamente.

Para el estudio de unión entre los dominios C2AB de rabfilina 3A con lípidos. Se empleó el buffer descrito anteriormente al que se le añadió una cantidad de calcio saturante (1 mM). La disolución con la mezcla lipídica se cargó en una jeringa de 500 μl y se tituló la muestra a la que se añadió también una concentración saturante de calcio (1 mM) con 19 inyecciones de 15 μl cada una. La velocidad de inyección fue de 1 $\mu\text{l}/\text{segundo}$ con una agitación de 260 rpm y un intervalo de 300 segundos. La concentración de la proteína y de la mezcla lipídica fue de 11 μM (0.4 mg/ml) y 0.342 mM para la mezcla que contenía POPS y $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$.

4.2.-DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS).

Cuando la luz incide en la materia, el campo eléctrico de la luz induce una polarización oscilante de los electrones en las moléculas. De manera que las moléculas actúan como fuentes de luz secundarias que son capaces de dispersar luz. Los desplazamientos de frecuencia, distribución angular, polarización y la intensidad de la luz dispersada están determinados por el tamaño, la forma y las interacciones moleculares del material dispersante. De este modo, mediante dispersión de luz se puede obtener información sobre la estructura y dinámica molecular del medio dispersante.

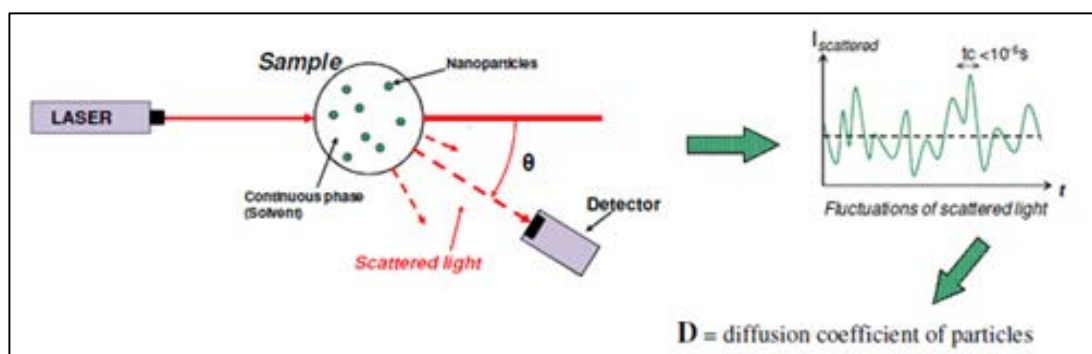


Figura II.6: Ilustración del principio de la Dispersión Dinámica de la Luz. El movimiento browniano de las partículas en suspensión hace que la luz láser se disperse a diferentes intensidades. Con el análisis de las fluctuaciones, que son consecuencia del movimiento browniano de las partículas, se obtiene la velocidad del movimiento browniano y permite la determinación del coeficiente de difusión y del tamaño de las partículas mediante la ecuación de Stokes-Einstein.

La Dispersión Dinámica de la Luz es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión o macromoléculas en solución tales como proteínas o macromoléculas. La luz láser alcanza las numerosas partículas que hay en una suspensión, y ésta se dispersa en todas las direcciones posibles. Los haces de luz dispersados por diferentes partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían de manera constante entre sí lo que provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión (Dorfmueller, 1987). La

intensidad de la dispersión es proporcional al coeficiente de difusión de la muestra, y la difusión será menor en partículas de mayor tamaño. El coeficiente de difusión se calcula a partir de la variación del coeficiente de auto-correlación en función del tiempo. El porcentaje de luz dispersada frente al radio hidrodinámico permite estimar la posibilidad de la muestra y por tanto conocer la homogeneidad de la muestra, de manera que cuanto mayor es la homogeneidad, menor es la polidispersión.

El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto sino a la vibración de las partículas que la componen. Se trata por tanto de una técnica que permite detectar la presencia de agregados en solución y es capaz de determinar el tamaño de los mismos.

En un experimento de dispersión de luz, un haz de luz es enfocado sobre la muestra en disolución siendo ésta dispersada y posteriormente llegando a un detector. La posición del detector respecto al haz de luz incidente define el ángulo de dispersión θ .

Si durante un tiempo se sigue el movimiento de una molécula en un gas o líquido, el movimiento observado parecerá errático debido a las muchas colisiones que experimenta durante la observación. Si este tiempo fuera dividido en intervalos muy pequeños, Δt , entonces el desplazamiento total de la partículas en el tiempo t , $\Delta R(t)$, es la suma de todos los desplazamientos que tienen lugar para cada Δt , que en general será una distribución de saltos de longitud. Las macromoléculas tienen un tamaño muy superior al de las moléculas del disolvente, y por tanto una velocidad media mucho más baja. En el movimiento browniano se asume que la fuerza sobre una partícula browniana, consiste en una componente friccional sistemática y una componente fluctuante o al azar. La ecuación del movimiento de una partícula browniana (ecuación de Langevin) es:

$$M(dV/dt) = -\zeta v + F(t)$$

donde el coeficiente de fricción, ζ , es proporcional a la viscosidad del disolvente, η , y el radio de la esfera, a , según la ecuación de Stokes.

$$d(H) = \frac{KT}{3\pi\eta D}$$

D: velocidad de difusión

K: constante de Boltzmann

T: temperatura absoluta

η : viscosidad de la disolución

$d(H)$: diámetro hidrodinámico de las moléculas en disolución

El DLS aporta un correlograma que proporciona información sobre la muestra, el momento en que la correlación comienza a descender significativamente es indicativo del tamaño medio de la muestra.

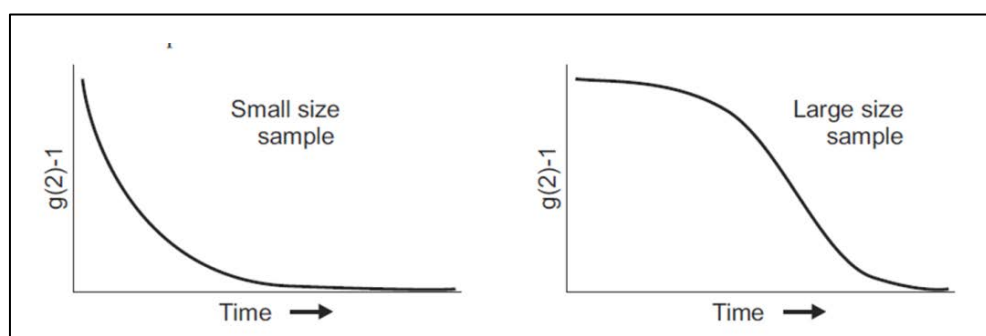


Figura II.7: Correlograma para una partícula. Tamaño grande (derecha) donde la correlación de las señales tarda en decaer y el correspondiente para una partícula de tamaño pequeño (izquierda) donde la correlación de señales desciende más rápido.

El DLS muestra dos tipos de distribución, por intensidad y por volumen. De modo que si tenemos dos partículas a distintos tamaños pero en igual cantidad y observamos la distribución en volumen, se verá el pico de la partícula más grande y si convertimos la distribución a intensidad se observará que una de las poblaciones es mucho mayor que la otra puesto que debido a que las ecuaciones son exponenciales, un ligero cambio de la partícula provoca una importante diferencia en la proporción de los picos.

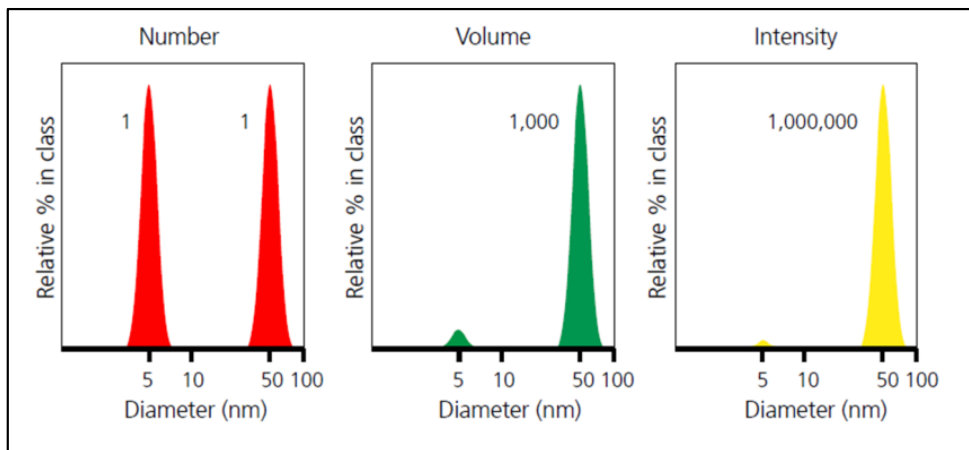


Figura II.8: Distribución en número, volumen y tamaño para una mezcla que contiene igual número de partículas de tamaño 5 nm y 50 nm.

El DLS también mide el ancho del pico, que es representativo de la polidispersidad de la muestra. Varias estructuras pueden quedar reflejadas como un único pico, e interpretando el ancho del pico se puede determinar si la muestra se encuentra de forma monodispersa y uniforme en disolución, o si por el contrario, se halla en forma polidispersa.

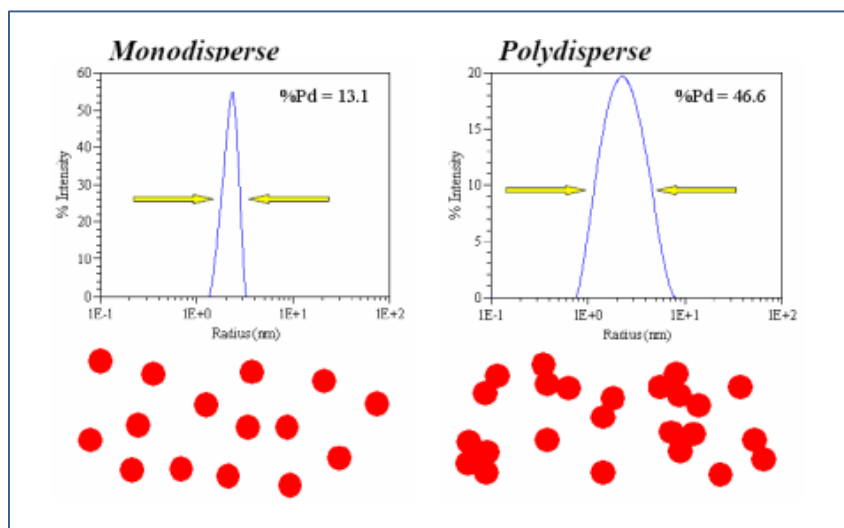


Figura II.9: Muestras de proteína de tamaño monodisperso (izquierda) y polidisperso (derecha)

Materiales y Métodos

Los experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se llevaron a cabo con un instrumento ZetaSizer Nano ZS de Malvern Instrument (USA). Para ello se realizó una acumulación sobre un tiempo adecuado para asegurar una buena estadística de la medida. Adicionalmente cada muestra fue medida diversas veces para mejorar la estadística y descartar la aparición de posibles evoluciones temporales en el comportamiento de la muestra. Todas las medidas se realizaron a una temperatura de 25°C con un ángulo de detección a 90°C.

Para el desarrollo de los experimentos de esta Tesis Doctoral se empleó el buffer 25 mM Hepes pH 7.4 100 mM NaCl, en el que se diluyó la proteína y la mezcla lipídica. En un primer paso se preparó la solución que contenía la mezcla lipídica a una concentración de 20 μM con 200 μM de CaCl_2 y se determinó el tamaño de las vesículas. A continuación se añadió la proteína a 53 nM y se dejó incubar durante 15 minutos, transcurrido este tiempo se midió el tamaño de la formación de agregados. En los experimentos realizados en ausencia de calcio, se añadió 1 mM de EGTA.

Para el análisis de las funciones de autocorrelación se utilizó el método CONTIN capaz de resolver las ecuaciones integrales de primer orden y sistemas de ecuaciones algebraicas lineales (*Berne&Pecora., 2000*). Se utiliza generalmente en los casos en que los datos experimentales presentan una componente de ruido como es en los sistemas multicomponentes. En este caso la distribución continua de tamaño se determina mediante un algoritmo de Transformada de Laplace inversa. Con este análisis se obtiene información numérica y gráficos de distribución de tamaño.

También se hizo un análisis Monomodal o Cumulantes, que permite ajustar una exponencial simple a la función de correlación para obtener el tamaño promedio (diámetro Z-Average) y una estimación del ancho de la distribución, conocido como el índice de polidispersidad, que da información sobre el grado de agregación. El diámetro Z-Average da un valor promedio, aunque inadecuado para dar una descripción completa de la distribución de los tamaños en una muestra, puesto que solo nos daría una información fiable en el caso de muestras monodispersas.

4.3.- RESONANCIA DE PLASMÓN DE SUPERFICIE (SPR).

Un biosensor es un dispositivo analítico de pequeño tamaño formado por un sistema biológico de reconocimiento específico inmovilizado, conocido como biorreceptor en contacto con un sistema transductor que convierte la interacción en una señal cuantificable. Los biosensores con detección por Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR) permiten obtener información cinética de la interacción entre un ligando y un receptor a tiempo real. Destacan por su relativa simplicidad, sensibilidad y selectividad.

El empleo de esta técnica versa de finales de los años 60 para el estudio de procesos superficiales en metales, la detección de interacciones biomoleculares con esta técnica data de principios de los años 80 por parte de Liedberg, Nylander y Lundström.

Se trata de un fenómeno óptico que tiene lugar en una superficie metálica cuando existe un cambio en el índice de refracción de dos medios distintos. Cuando se produce una variación en la masa de la superficie, por ejemplo una interacción entre dos moléculas, se origina un cambio en el índice de refracción y, por lo tanto, el ángulo de la luz reflejada a la cual se produce la resonancia entre la luz y el plasmón de superficie varía. La diferencia es proporcional a la cantidad de sustrato unido a la superficie, mientras que la velocidad a la que tiene lugar el cambio de ángulo depende de la cinética de la interacción.

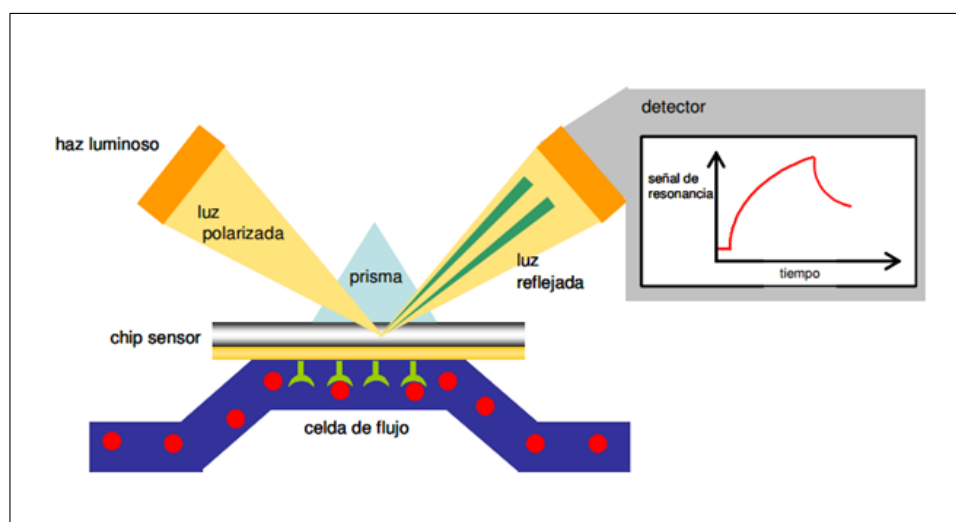


Figura II.10: Esquema general de detección de un biosensor por SPR. El fenómeno de SPR ocurre cuando las ondas del plasmón de superficie son excitadas en una interfase metal/líquido. La luz se dirige hacia y se refleja desde el lado de la superficie que no está en contacto con la muestra, el SPR produce una reducción en la intensidad de la luz reflejada en una combinación específica de ángulo y longitud de onda. Los eventos de unión causan cambios en el índice de refracción en la capa superficial que se traduce en cambios en la señal de SPR. Imagen tomada de BioPhysicsCoreFacilities.

La respuesta de la unión del ligando al receptor se mide en unidades arbitrarias de resonancia (RUs) y representan la cantidad de materia unida a la superficie, en el caso de las proteínas, 1000 RU son equivalentes a $1 \text{ nmol L}^{-1} \text{ mm}^{-2}$. La cinética de la interacción se obtiene a partir del cambio de la respuesta frente al tiempo y la relación entre la respuesta (RU) y el tiempo (t) en segundo determina el sensograma.

Un sensograma representa el resultado de la interacción entre un analito y un receptor. El ligando es inmovilizado en la superficie y una vez inmovilizado el analito fluye sobre la superficie teniendo lugar la interacción, ello genera un aumento en la señal hasta llegar a un punto en el que la superficie se satura y la señal se estabiliza. En este momento comienza la fase de disociación del analito. Por último, se produce la regeneración de la superficie del chip eliminando todo el analito, quedando la superficie preparada para una nueva medida. La cinética de la interacción se obtiene analizando las curvas de asociación (K_a) y disociación (K_d)

que varían en el tiempo para diferentes concentraciones de analito, pudiéndose obtener la constante de afinidad K .

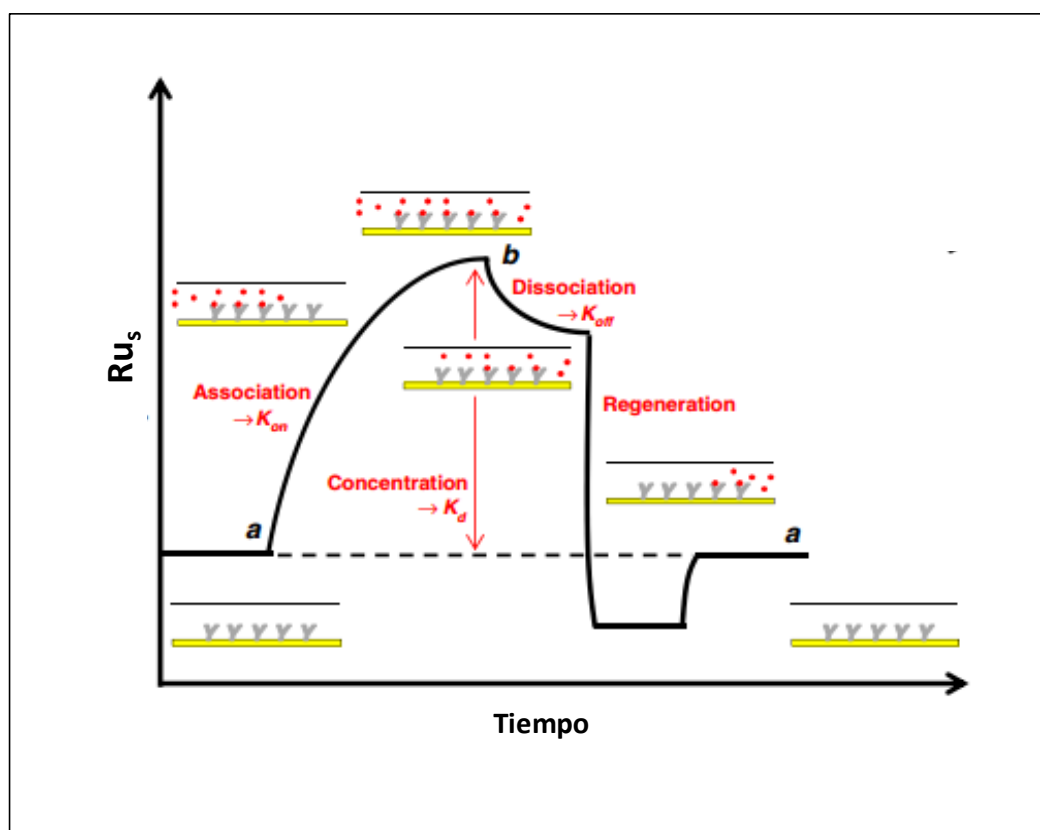


Figura II.11: Sensograma. Respuesta de un experimento de SPR. Una vez inmovilizado el ligando en la superficie, el analito fluye sobre la misma y tiene lugar la potencial interacción entre ambos, lo que se traduce en un aumento de la intensidad de la señal que se mide en unidades de resonancia (RUs) hasta llegar a un punto en el que la superficie se encuentra saturada y la señal se estabiliza. En este momento se inicia la fase de disociación. Por último se lleva a cabo la regeneración de la superficie del chip eliminando todo el analito quedando la superficie lista para una nueva medida. La cinética de la interacción se obtiene analizando las curvas de asociación (K_a) y disociación (K_d) que van variando a lo largo del tiempo para diferentes concentraciones de analito, pudiéndose obtener la constante de afinidad K .

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral se estudia la potencial interacción entre la proteína SNAP25 y el analito, rabfilina 3A. La proteína SNAP25 se acopla de modo covalente a un chip de matriz de carboximetildextrano por aminas: CM5. Posteriormente los analitos, potenciales ligando de esta proteína se inyectan sobre el chip diluidos en tampón 10 mM Hepes 150 mM NaCl. Cuando hay unión la variación de masa producida en la superficie del chip provoca un cambio en la

reflexión que se traduce en un incremento de señal que se cuantifica como unidades de resonancia (RUs). Tras la asociación, se pasa un tampón de lavado sobre el chip que produce la disociación de los analitos y en consecuencia se observa una caída en la señal de RUs en el sensograma. Para llevar la señal a los niveles basales y preparar al chip para una nueva interacción, se inyecta sobre el chip una solución de regeneración para disociar las moléculas de analito que puedan quedar unidas al ligando. Estos experimentos se llevaron a cabo con un biosensor tipo SensiQ[®] Discovery en el laboratorio de biofísica de proteínas del Dr. D'Auria en el ISA-CNR Avellino, Italia.

4.4.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La microscopía electrónica de transmisión se basa en un haz de electrones que a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada en una columna de alto vacío. Parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. Todas estas señales se pueden emplear para obtener información sobre la naturaleza de la muestra: morfología, composición, estructura cristalina, etc. Este tipo de microscopía entre otras, se emplea para formar imágenes (*Carter, MacPherson, & McKenzie, 1996*). En un TEM los electrones son emitidos en la parte superior de la columna. Los electrones se generan por efecto termo-iónico en un filamento de wolframio y se monocromatizan acelerándolos a través de un potencial en un sistema sometido a vacío. Posteriormente, el haz de electrones primario es modificado por un sistema de lentes magnéticas llamado sistema condensador. A continuación, el haz de electrones alcanza la muestra interactuando con ésta para llegar a un sistema de lentes magnéticas (objetivo y proyector) encargadas de formar y magnificar la imagen que se deberá recoger sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla sensible al impacto de los electrones. Este tipo de microscopía sólo genera imágenes en blanco y negro puesto que no utilizan la luz visible.

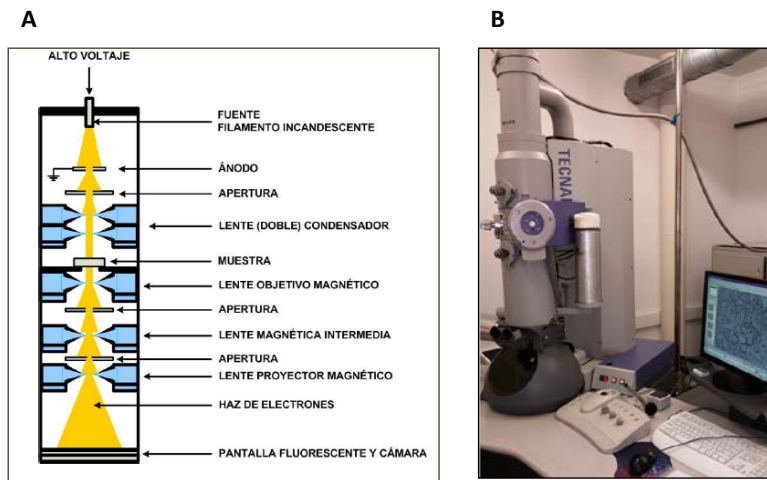


Figura II.12: Esquema de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) A) Equipo utilizado en esta tesis doctoral: microscopio electrónico PHILIPS TECNAI 12.

4.5.-ENSAYOS DE SEDIMENTACIÓN LIPÍDICA.

Se prepararon vesículas multilamerales (MLVs) con mezclas que contenían POPS/POPC/PIP₂ (25:65:10) y fueron tratadas con nitrógeno gaseoso y bajo atmósfera de vacío durante 3 horas. Los lípidos secos fueron resuspendidos en el buffer adecuado y que permite la hidratación por debajo de la temperatura de transición de la mezcla durante 30-60 minutos. Para llevar a cabo los experimentos se mezclaron Rabfilina 3A C2AB y SNAP25 durante 5 minutos a 25°C, entonces se añadió 200 µM de CaCl₂ y posteriormente 1mM de la mezcla lipídica. La mezcla fue incubada durante 5 minutos a 25°C y a continuación se centrifuga a 34000xg durante 20 minutos (*Buser & McLaughlin, 1998*). Pasado este tiempo se separó la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción unida a los lípidos (pellet) y fue analizada mediante electroforesis 17% SDS-PAGE. Los geles fueron teñidos con Commassie Brilliant Blue G250. La cuantificación de los resultados fue llevada a cabo con el programa Analize/Gels FIJI-ImageJ.

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN DE CALCIO A LOS DOMINIOS C2 DE RABFILINA 3A

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017".

CAPÍTULO IV

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE RABFILINA 3A CON LA MEMBRANA LIPÍDICA

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017".

CAPÍTULO V

EL DOMINIO C2AB DE RABFILINA 3A ES CAPAZ DE PRODUCIR AGREGACIÓN DE VESÍCULAS LIPÍDICAS

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017".

CAPÍTULO VI

INTERACCIÓN DE RABFILINA 3A CON EL COMPLEJO SNARE

"Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios institucionales.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha 9 de mayo de 2017".

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

"Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la
ciencia, no podrá comprender su tiranía"
Frankenstein. Mary Shelley

1. DISCUSIÓN GENERAL.

La fusión de membranas es un proceso fundamental en biología. Está altamente controlado y las membranas mantienen su integridad hasta el momento en el que se forma el poro de fusión entre ellas.

Durante el proceso de fusión la membrana está sometida a grandes cambios conformacionales. Todos estos cambios están controlados por diferentes proteínas. La función de estas proteínas es reducir la barrera energética que se observa durante este proceso. La fusión de membranas juega un papel crucial en un amplio rango de procesos biológicos y está estrechamente regulado por una serie de señales que conllevan sólo a la fusión sólo cuando es necesario. Uno de los más estudiados e importantes es la fusión de membranas dependiente de calcio de vesículas en células secretoras, como neuronas y células cromafines. Existe un gran número de proteínas capaces de unir calcio, algunas de las cuales están implicadas en la exocitosis dependiente de calcio.

La rabfilina 3A es una proteína implicada de forma calcio dependiente en la regulación de la exocitosis de vesículas secretoras en neuronas y células neuroendocrinas. Es capaz de interactuar a través de su extremo amino terminal con las GTPasas Rab3A y Rab27 y se identifican dos dominios C2 dispuestos en tándem, denominados C2A y C2B, capaces de unir calcio y fosfolípidos.

Los dominios C2 fueron identificados como el segundo de los dominios conservados en la PKC. Muchas de las proteínas identificadas en el proceso de fusión contienen dominios C2. A pesar de compartir la misma estructura participan en diferentes etapas de este proceso. Estudios bioquímicos han demostrado que estos dominios C2 aislados, así como el tándem C2AB, presentan diferencias en relación a la afinidad por diferentes fosfoinosítidos y por calcio.

El objeto de esta Tesis Doctoral ha sido caracterizar la estructura y la función de la rabfilina 3A en su capacidad de unirse a la membrana y a otras proteínas.

Mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC), dispersión dinámica de la luz (DLS) y ensayos de sedimentación lipídica, junto con el estudio de mutaciones clave en los dominios C2AB de rabfilina 3A se ha conseguido caracterizar el modo en que esta proteína podría interactuar con la membrana así como con otras proteínas, proponiendo un modelo que acoplaría a esta proteína en el complejo escenario de la fusión vesicular.

Los dominios C2A y C2B muestran un comportamiento termodinámico y unen calcio de forma diferente a pesar de ser estructuralmente similares. La unión de calcio a los dominios aislados como al dominio en tándem no genera un gran cambio conformacional, a excepción del dominio C2A de rabfilina 3A que precisa de una reorganización de los residuos de ácido aspártico que participan en la unión a calcio localizados en la zona de unión a calcio (CBR) que explicaría la baja afinidad de este dominio por este ion. El dominio C2AB en tándem podría albergar hasta 3 iones calcio que se coordinan con residuos de ácido aspártico de la zona de CBR. Ambos dominios actúan de forma dependiente tal y como se ha visto mediante el estudio de mutantes en la zona del CBR. El efecto de mutaciones en la zona del conector entre ambos dominios, así como en la hélice H2 del dominio C2B no afectan a la capacidad de unir calcio por parte de la proteína, lo que sugiere que es a través de la coordinación del calcio con los residuos de ácido aspártico localizados en los lazos situados en la parte superior del dominio por donde se produce la unión.

La unión de calcio al dominio en tándem altera el potencial electrostático de la proteína lo que favorece la interacción con los fosfoinosítidos, POPS y PI(4,5)P₂ presentes en la membrana. La obtención de la estructura cristalina del dominio C2 de la PKC α , así como del dominio C2A de rabfilina 3A con calcio y PI(4,5)P₂ han ayudado a comprender el mecanismo molecular por el que estos dominios se unen a la membrana. Basados en estas estructuras, se diseñaron mutantes con la finalidad de caracterizar la unión del dominio en tándem de la proteína a la membrana; y mediante el análisis termodinámico de diferentes membranas modelo con distinta composición lipídica se determinó que la presencia de POPS y PI(4,5)P₂, así como de calcio favorecerían la unión del dominio C2AB a la membrana. Con los resultados obtenidos tras el estudio de la proteína silvestre, combinado con el análisis de

Discusión General y Conclusiones

calorimétrico de las especies mutantes generadas con residuos afectados en la región de unión a calcio, región de las lisinas, zona del conector entre ambos dominios y la hélice H2 del dominio C2B, se puede concluir, que el dominio C2A de rabfilina 3A se uniría a la membrana principalmente a través de las lisinas localizadas en el LCR (*Lysine Rich Cluster*) y que la presencia de calcio ayudaría a la unión, pero no resultaría imprescindible. En cambio la zona de las lisinas del C2B estaría bloqueada por el dominio C2A, uniéndose éste probablemente a la membrana por la región de unión a calcio con la POPS implicando la necesidad de calcio en dicha interacción. La zona del conector entre C2A y C2B así como la hélice H2 del dominio C2B no afectan a la capacidad de unión de la proteína a la membrana. El residuo D429 localizado en el lazo 1 del CBR (*Calcium Binding Region*) del dominio C2A, actúa de forma que es imprescindible para que la proteína se una a la membrana. Este residuo de alguna forma podría estar estableciendo algún tipo de interacción entre el propio dominio o con el dominio C2B, favoreciendo su unión a la membrana.

La capacidad de los dominios C2AB de rabfilina 3A para formar agregados de vesículas con carga resulta un hecho indicativo del papel que esta proteína podría desempeñar en el proceso de exocitosis y fusión vesicular. Se trata de un fenómeno dependiente del calcio. Mediante ensayos de agregación y de dispersión dinámica de la luz se propone un modelo en el que el C2AB de rabfilina 3A podría interactuar a través del dominio C2A y cooperar con las proteínas del complejo SNARE a través de la hélice H2 del dominio C2B, aproximando y acelerando de este modo el proceso de fusión. Con estudios de construcciones mutantes se ha determinado que la región de las lisinas del dominio C2A no afecta de modo significativo a la capacidad de agregación al igual que ocurre con otros residuos críticos en el proceso de unión a la membrana como es el caso del residuo D429. El tamaño de los agregados es un 35% aproximadamente, menor que en la especie silvestre. Las construcciones afectadas en la región de las lisinas y del calcio del dominio C2B no tienen efecto en la capacidad de agregación. Los residuos clave en la formación de los agregados son los aminoácidos de la zona del conector E539/E540, que podrían actuar como freno del proceso de agregación-fusión, puesto que cuando se mutaron a alanina el tamaño de los agregados aumentó en un 150% más respecto a la proteína silvestre. De igual

modo la mutación en los residuos de la hélice H2 del dominio C2B impide de modo drástico la formación de agregados.

La potencial capacidad de interacción entre el dominio C2AB con el complejo SNARE fue corroborada con la obtención de la estructura cristalina del dominio C2B-Rph3A con el SNAP25. En la literatura está descrito que el dominio C2B interactúa a través de la hélice H2 con el SNAP25 en una relación estequiométrica 1:1. Existe una elevada homología entre sinaptotagmina 1 y rabfilina 3A y ambas se ha demostrado que interactúan con el SNAP25, pero en este trabajo se ha determinado que la interacción con el SNAP25 es a través de residuos diferentes, de forma que no existiría competencia entre ambas proteínas por la unión al complejo SNARE, lo que sugiere la posible participación de estas proteínas en diferentes procesos de la exocitosis vesicular. Mediante ensayos de ITC y sedimentación lipídica se ha determinado que el dominio C2AB de rabfilina 3A podría estar interactuando de modo simultáneo con PI(4,5)P₂, Ca²⁺ y SNAP25 lo que demuestra que no hay competencia entre la unión a la membrana por parte del dominio el SNAP25 o con el complejo SNARE. Experimentos de sedimentación lipídica han determinado que C2AB-Rph3A es capaz de interactuar con SNAP25/STX1A-H3 y SNAP25/STX1A-H3/VAMP2 en los que se corrobora la importancia de la hélice H2 del dominio C2B así como los residuos de la región amino terminal del SNAP25 en la formación del complejo.

Con estos datos se propone un modelo en el que la vesícula es reclutada hacia la membrana plasmática donde interactúa a través del dominio RBD, (*Rab Binding Domain*), localizado en el extremo amino terminal de rabfilina 3A. En este punto el dominio C2A-Rph3A es capaz de unirse a la membrana por la región rica en lisinas, mientras que el C2B-Rph3A queda accesible para interactuar con el SNAP25. La llegada de calcio al sistema permite que el C2AB-Rph3A interactúe a través del CBR (*Calcium Binding Region*) con la membrana por un punto adicional. Todo este conjunto de interacciones provoca la distorsión de la membrana y termina con la formación de un poro y por ende la fusión entre las vesículas.

Existen evidencias fisiológicas y moleculares que indican que la unión de los dominios a la membrana principalmente a través del PI(4,5)P₂ participan en los

Discusión General y Conclusiones

procesos de exocitosis y endocitosis en el tráfico vesicular y que la alteración en esta unión provoca una serie de alteraciones a nivel presináptico fundamentalmente, aunque recientemente se ha descrito su papel a nivel postsináptico.

Uno de los principales problemas que existen es el desconocimiento acerca de la formación de los complejos proteicos así como su papel y su relación con otros complejos formados, en cada una de las etapas que conllevan a una transmisión sináptica correcta. Todo esto lleva a seguir estudiando las interacciones entre estas proteínas, que permitan comprender como participan en este proceso y compararla con otros complejos que también participan. Con esta información se podría comprender el mecanismo por el que defectos en estas proteínas causan enfermedades de tipo neurodegenerativo, permitiendo de este modo establecer nuevas estrategias para su diagnóstico y tratamiento.

2.- CONCLUSIONES.

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

1.- Los dominios C2 aislados y formando parte del tándem C2AB de rabfilina 3A presentan diferencias de afinidad por los fosfoinosítidos, así como por su afinidad por calcio. Todo esto podría implicar un modo de regulación de la transmisión sináptica y los procesos de secreción.

2.-Mediante calorimetría de titulación isotérmica se ha determinado la especificidad de los dominios para interactuar con membranas formadas por POPC/POPS/PI(4,5)P₂. La presencia de calcio influye en la unión de la proteína a la membrana.

3.-La orientación de los dominios es determinante para caracterizar cómo estos se unen a la membrana. De modo que el dominio C2A-Rph3A es capaz de interactuar a través de su región rica en lisinas con el PI(4,5)P₂; la presencia de calcio favorece esta interacción de este modo el dominio podría unirse por otro punto de contacto

con la membrana, la región de unión a calcio, a través de la POPS. La zona de las lisinas del C2B-Rph3A estaría bloqueada por el dominio C2A, dándole a este dominio un papel secundario en el papel de unión a la membrana.

4.-El dominio C2AB de rabfilina 3A es capaz de formar agregados con vesículas con carga. La región determinante que favorece la formación de agregados es la hélice H2 del dominio C2B de rabfilina 3A.

5.-Existen dos residuos que resultan clave en el control de la unión a la membrana de esta proteína. El ácido aspártico 429, localizado en el lazo 1 de la región de unión al calcio del dominio C2A-Rph3A permite que la zona de las lisinas quede accesible, el modo de actuación todavía está por discernir. Por otro lado, los residuos E539/E540 localizados en la zona del conector actuarían como freno, de forma que cuando son mutados aceleran de algún modo el proceso de fusión.

6.-La obtención de la estructura cristalina del dominio C2B-SNAP25 ha permitido determinar los residuos que participan directamente en dicha interacción, demostrando que este tipo de unión es diferente a la observada en la sinaptotagmina 1, sensor principal en el proceso de exocitosis. Sugiriendo que estas proteínas junto con el complejo SNARE podrían participar en diferentes etapas de la exocitosis.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

- Aikawa, Y., & Martin, T. F. J. (2003). ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 162(4), 647–659. <http://doi.org/10.1083/jcb.200212142>
- Alabi, A. A., & Tsien, R. W. (2012). Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(8), a013680. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a013680>
- Alfadhli, A., & Barklis, E. (2014). The roles of lipids and nucleic acids in HIV-1 assembly. *Frontiers in Microbiology*, 5, 253. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00253>
- Anderluh, A., Hofmaier, T., Klotzsch, E., Kudlacek, O., Stockner, T., Sitte, H. H., & Schütz, G. J. (2017). Direct PIP2 binding mediates stable oligomer formation of the serotonin transporter. *Nature Communications*, 8, 14089. <http://doi.org/10.1038/ncomms14089>
- April A. Frazier, ‡, Mark A. Wisner, §, Nathan J. Malmberg, §, Kenneth G. Victor, ‡, Gail E. Fanucci, ‡, Eric A. Nalefski, §, †, ... David S. Cafiso*, ‡. (2002). Membrane Orientation and Position of the C2 Domain from cPLA2 by Site-Directed Spin Labeling†. <http://doi.org/10.1021/BI0160821>
- Araç, D., Chen, X., Khant, H. A., Ubach, J., Ludtke, S. J., Kikkawa, M., ... Rizo, J. (n.d.). Close membrane-membrane proximity induced by Ca²⁺-dependent multivalent binding of synaptotagmin-1 to phospholipids. <http://doi.org/10.1038/nsmb1056>
- Bai, J., & Chapman, E. R. (2004). The C2 domains of synaptotagmin – partners in exocytosis. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(3), 143–151. <http://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.01.008>
- Bai, J., Tucker, W. C., & Chapman, E. R. (2004). PIP2 increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(1), 36–44. <http://doi.org/10.1038/nsmb709>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <http://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Biadene, M., Montaville, P., Sheldrick, G. M., & Becker, S. (2006a). Structure of the C2A domain of rabphilin-3A. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. <http://doi.org/10.1107/S0907444906017537>
- Biadene, M., Montaville, P., Sheldrick, G. M., & Becker, S. (2006b). Structure of the C2A domain of rabphilin-3A. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 62(7), 793–799. <http://doi.org/10.1107/S0907444906017537>
- Bolsover, S. R., Gomez-Fernandez, J. C., & Corbalan-Garcia, S. (2003). Role of the Ca²⁺/phosphatidylserine binding region of the C2 domain in the translocation of protein kinase Calpha to the plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(12), 10282–90. <http://doi.org/10.1074/jbc.M212145200>
- Brewer, K. D., Bacaj, T., Cavalli, A., Camilloni, C., Swarbrick, J. D., Liu, J., ... Rizo, J. (2015). Dynamic binding mode of a Synaptotagmin-1–SNARE complex in solution. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(7), 555–564. <http://doi.org/10.1038/nsmb.3035>
- Brewer, K. D., Bacaj, T., Cavalli, A., Camilloni, C., Swarbrick, J. D., Liu, J., ... Rizo, J. (2015). Dynamic binding mode of a Synaptotagmin-1–SNARE complex in solution. *Nature Structural & Molecular Biology*. <http://doi.org/10.1038/nsmb.3035>
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y., & Südhof, T. C. (1995). Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(42), 25273–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559667>
- Brose, N., Petrenko, A. G., Südhof, T. C., & Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5059), 1021–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1589771>

- Brunger, A. T., Weninger, K., Bowen, M., & Chu, S. (2009). Single-Molecule Studies of the Neuronal SNARE Fusion Machinery. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 903–928. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.070306.103621>
- Burns, M. E., Sasaki, T., Takai, Y., & Augustine, G. J. (1998a). Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic. *The Journal of General Physiology*, 111(2), 243–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450942>
- Burns, M. E., Sasaki, T., Takai, Y., & Augustine, G. J. (1998b). Rabphilin-3A: a multifunctional regulator of synaptic vesicle traffic. *The Journal of General Physiology*, 111(2), 243–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450942>
- Buser, C. A., & McLaughlin, S. (1998). Ultracentrifugation Technique for Measuring the Binding of Peptides and Proteins to Sucrose-Loaded Phospholipid Vesicles. In *Transmembrane Signaling Protocols* (Vol. 84, pp. 267–282). New Jersey: Humana Press. <http://doi.org/10.1385/0-89603-488-7:267>
- Carter, P. L., MacPherson, D. W., & McKenzie, R. A. (1996). Modified technique to recover microsporidian spores in sodium acetate-acetic acid-formalin-fixed fecal samples by light microscopy and correlation with transmission electron microscopy. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(11), 2670–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897162>
- Chapman, E. R. (2002a). Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7), 498–508. <http://doi.org/10.1038/nrm855>
- Chapman, E. R. (2002b). Synaptotagmin: A Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(7), 498–508. <http://doi.org/10.1038/nrm855>
- Chapman, E. R. (2008). How Does Synaptotagmin Trigger Neurotransmitter Release? *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), 615–641. <http://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062005.101135>
- Chen, R. H. C., Wislet-Gendebien, S., Samuel, F., Visanji, N. P., Zhang, G., Marsilio, D., ... Tandon, A. (2013). α -Synuclein membrane association is regulated by the Rab3a recycling machinery and presynaptic activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7438–49. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.439497>
- Chicka, M. C., Hui, E., Liu, H., & Chapman, E. R. (2008). Synaptotagmin arrests the SNARE complex before triggering fast, efficient membrane fusion in response to Ca²⁺. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(8), 827–35. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1463>
- Cho, W., & Stahelin, R. V. (2006). Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(8), 838–849. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.06.014>
- Choi, U. B., Strop, P., Vrljic, M., Chu, S., Brunger, A. T., & Weninger, K. R. (2010). Single-molecule FRET-derived model of the synaptotagmin 1–SNARE fusion complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(3), 318–324. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1763>
- Chung, S. H., Song, W. J., Kim, K., Bednarski, J. J., Chen, J., Prestwich, G. D., & Holz, R. W. (1998). The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca²⁺-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10240–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553075>
- Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., ... Knopf, J. L. (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, 65(6), 1043–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1904318>
- Conesa-Zamora, P., Lopez-Andreo, M. J., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2001). Identification of the phosphatidylserine binding site in the C2 domain that is

Bibliografía

- important for PKC alpha activation and in vivo cell localization. *Biochemistry*, 40(46), 13898–905. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705379>
- Connell, E., Giniatullina, A., Lai-Kee-Him, J., Tavare, R., Ferrari, E., Roseman, A., ... Davletov, B. (2008). Cross-linking of Phospholipid Membranes is a Conserved Property of Calcium-sensitive Synaptotagmins. *Journal of Molecular Biology*, 380(1), 42–50. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.01.084>
- Corbalán-García, S., García-García, J., Rodríguez-Alfaro, J. A., & Gómez-Fernández, J. C. (2003). A new phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-binding site located in the C2 domain of protein kinase Ca. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.M209385200>
- Corbalan-Garcia, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2014). Signaling through C2 domains: More than one lipid target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(6), 1536–1547. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.008>
- Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2006). Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(7), 633–654. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.04.015>
- Corbalán-García, S., Sánchez-Carrillo, S., García-García, J., & Gómez-Fernández, J. C. (2003). Characterization of the Membrane Binding Mode of the C2 Domain of PKC ϵ . *Biochemistry*, 42(40), 11661–11668. <http://doi.org/10.1021/bi034850d>
- Coudeville, N., Montaville, P., Leonov, A., Zweckstetter, M., & Becker, S. (2008a). Structural determinants for Ca²⁺ and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding by the C2A domain of rabphilin-3A. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.M804094200>
- Coudeville, N., Montaville, P., Leonov, A., Zweckstetter, M., & Becker, S. (2008b). Structural determinants for Ca²⁺ and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding by the C2A domain of rabphilin-3A. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(51), 35918–28. <http://doi.org/10.1074/jbc.M804094200>
- Coussens, L., Parker, P. J., Rhee, L., Yang-Feng, T. L., Chen, E., Waterfield, M. D., ... Ullrich, A. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4766), 859–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3755548>
- Czech, M. P. (2000). PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface. *Cell*, 100(6), 603–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10761925>
- Damer, C. K., & Creutz, C. E. (1994). Synergistic membrane interactions of the two C2 domains of synaptotagmin. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(49), 31115–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7983052>
- Deák, F., Shin, O.-H., Tang, J., Hanson, P., Ubach, J., Jahn, R., ... Südhof, T. C. (2006). Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *The EMBO Journal*, 25(12), 2856–2866. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601165>
- Deak, F., Shin, O. H., Tang, J., Hanson, P., Ubach, J., Jahn, R., ... Südhof, T. C. (2006). Rabphilin regulates SNARE-dependent re-priming of synaptic vesicles for fusion. *Embo J*, 25(12), 2856–2866. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601165>
- de Wit, H., Walter, A. M., Milosevic, I., Gulyás-Kovács, A., Riedel, D., Sørensen, J. B., & Verhage, M. (2009). Synaptotagmin-1 Docks Secretory Vesicles to Syntaxin-1/SNAP-25 Acceptor Complexes. *Cell*, 138(5), 935–946. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.027>
- Degtyar, V., Hafez, I. M., Bray, C., & Zucker, R. S. (2013). Dance of the SNAREs: Assembly and Rearrangements Detected with FRET at Neuronal Synapses. *Journal of Neuroscience*, 33(13), 5507–5523. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2337-12.2013>
- Diao, J., Yoon, T.-Y., Su, Z., Shin, Y.-K., & Ha, T. (2009). C2AB: a molecular glue for lipid vesicles with a negatively charged surface. *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 25(13), 7177–80. <http://doi.org/10.1021/la901676e>

- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, *443*(7112), 651–7. <http://doi.org/10.1038/nature05185>
- Dorfmueller, T. (1987). R. Pecora (Ed.): *Dynamic light scattering - applications of photon correlation spectroscopy*, Plenum Press, New York and London 1985. 420 Seiten, Preis: \$ 59.90. *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie*, *91*(4), 498–499. <http://doi.org/10.1002/bbpc.19870910455>
- Downes, C. P., Gray, A., & Lucocq, J. M. (2005). Probing phosphoinositide functions in signaling and membrane trafficking. *Trends in Cell Biology*, *15*(5), 259–68. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.03.008>
- Eberhard, D. A., Cooper, C. L., Low, M. G., & Holz, R. W. (1990). Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. *The Biochemical Journal*, *268*(1), 15–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2160809>
- Emptage, N. J., Reid, C. A., & Fine, A. (2001). Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca²⁺ entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron*, *29*(1), 197–208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182091>
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of *Coot*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *66*(4), 486–501. <http://doi.org/10.1107/S09074444910007493>
- Evans, C. S., He, Z., Bai, H., Lou, X., Jeggle, P., Sutton, R. B., ... Chapman, E. R. (2016). Functional analysis of the interface between the tandem C2 domains of synaptotagmin-1. *Molecular Biology of the Cell*, *27*(6), 979–989. <http://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0503>
- Evans, J. H., Murray, D., Leslie, C. C., & Falke, J. J. (2006). Specific translocation of protein kinase Calpha to the plasma membrane requires both Ca²⁺ and PIP₂ recognition by its C2 domain. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(1), 56–66. <http://doi.org/10.1091/mbc.E05-06-0499>
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., & Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(26), 15781–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9861047>
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., ... Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, *410*(6824), 41–49. <http://doi.org/10.1038/35065004>
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., ... Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, *410*(6824), 41–9. <http://doi.org/10.1038/35065004>
- Friedrich, R., Groffen, A. J., Connell, E., van Weering, J. R. T., Gutman, O., Henis, Y. I., ... Ashery, U. (2008). DOC2B acts as a calcium switch and enhances vesicle fusion. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(27), 6794–806. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0538-08.2008>
- Friedrich, R., Yeheskel, A., & Ashery, U. (2010). DOC2B, C2 domains, and calcium: A tale of intricate interactions. *Molecular Neurobiology*, *41*(1), 42–51. <http://doi.org/10.1007/s12035-009-8094-8>
- Fukuda, M. (2013). Rab27 Effectors, Pleiotropic Regulators in Secretory Pathways. *Traffic*, *14*(9), 949–963. <http://doi.org/10.1111/tra.12083>
- Fukuda, M., Kanno, E., & Yamamoto, A. (2004). Rabphilin and Noc2 Are Recruited to Dense-core Vesicles through Specific Interaction with Rab27A in PC12 Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(13), 13065–13075. <http://doi.org/10.1074/jbc.M306812200>

Bibliografía

- Fukuda, M., Kojima, T., Aruga, J., Niinobe, M., & Mikoshiba, K. (1995). Functional diversity of C2 domains of synaptotagmin family. Mutational analysis of inositol high polyphosphate binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(44), 26523–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592870>
- Fukuda, M., & Mikoshiba, K. (2000). Doc2 γ , a Third Isoform of Double C2 Protein, Lacking Calcium-Dependent Phospholipid Binding Activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(2), 626–632. <http://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3520>
- Fuson, K. L., Montes, M., Robert, J. J., & Sutton, R. B. (2007). Structure of Human Synaptotagmin 1 C2AB in the Absence of Ca²⁺ Reveals a Novel Domain Association †. *Biochemistry*, 46(45), 13041–13048. <http://doi.org/10.1021/bi701651k>
- Gaffaney, J. D., Dunning, F. M., Wang, Z., Hui, E., & Chapman, E. R. (2008). Synaptotagmin C2B Domain Regulates Ca²⁺-triggered Fusion in Vitro: CRITICAL RESIDUES REVEALED BY SCANNING ALANINE MUTAGENESIS. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31763–31775. <http://doi.org/10.1074/jbc.M803355200>
- Gaffaney, J. D., Xue, R., & Chapman, E. R. (2014). Mutations that disrupt Ca²⁺-binding activity endow Doc2 β with novel functional properties during synaptic transmission. *Molecular Biology of the Cell*, 25(4), 481–94. <http://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0571>
- García-García, J., Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (1999). Effect of calcium and phosphatidic acid binding on the C2 domain of PKC alpha as studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 38(30), 9667–75. <http://doi.org/10.1021/bi9905765>
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), 717–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7954835>
- Gibrat, J. F., Madej, T., & Bryant, S. H. (1996). Surprising similarities in structure comparison. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(3), 377–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8804824>
- Gong, L.-W., Di Paolo, G., Diaz, E., Cestra, G., Diaz, M.-E., Lindau, M., ... Toomre, D. (2005). Phosphatidylinositol phosphate kinase type I regulates dynamics of large dense-core vesicle fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(14), 5204–5209. <http://doi.org/10.1073/pnas.0501412102>
- Groffen, A. J. A., Friedrich, R., Brian, E. C., Ashery, U., & Verhage, M. (2006). DOC2A and DOC2B are sensors for neuronal activity with unique calcium-dependent and kinetic properties. *Journal of Neurochemistry*, 97(3), 818–833. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03755.x>
- Groffen, A. J., Martens, S., Arazola, R. D., Cornelisse, L. N., Lozovaya, N., de Jong, A. P. H., ... Verhage, M. (2010a). Doc2b Is a High-Affinity Ca²⁺ Sensor for Spontaneous Neurotransmitter Release. *Science*, 327(5973), 1614–1618. <http://doi.org/10.1126/science.1183765>
- Groffen, A. J., Martens, S., Arazola, R. D., Cornelisse, L. N., Lozovaya, N., de Jong, A. P. H., ... Verhage, M. (2010b). Doc2b Is a High-Affinity Ca²⁺ Sensor for Spontaneous Neurotransmitter Release. *Science*, 327(5973), 1614–1618. <http://doi.org/10.1126/science.1183765>
- Groffen, A. J., Martens, S., Arazola, R. D., Cornelisse, L. N., Lozovaya, N., de Jong, A. P. H., ... Verhage, M. (2010c). Doc2b Is a High-Affinity Ca²⁺ Sensor for Spontaneous Neurotransmitter Release. *Science*, 327(5973), 1614–1618. <http://doi.org/10.1126/science.1183765>
- Guerrero-Valero, M., Ferrer-Orta, C., Querol-Audí, J., Marin-Vicente, C., Fita, I., Gómez-Fernández, J. C., ... Corbalán-García, S. (2009a). Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(16), 6603–7.

- <http://doi.org/10.1073/pnas.0813099106>
- Guerrero-Valero, M., Ferrer-Orta, C., Querol-Audí, J., Marin-Vicente, C., Fita, I., Gómez-Fernández, J. C., ... Corbalán-García, S. (2009b). Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5)P₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(16), 6603–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.0813099106>
- Guillen, J., Ferrer-Orta, C., Buxaderas, M., Perez-Sanchez, D., Guerrero-Valero, M., Luengo-Gil, G., ... Corbalan-Garcia, S. (2013). Structural insights into the Ca²⁺ and PI(4,5)P₂ binding modes of the C2 domains of rabphilin 3A and synaptotagmin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(51), 20503–20508. <http://doi.org/10.1073/pnas.1316179110>
- Guillén, J., Ferrer-Orta, C., Buxaderas, M., Pérez-Sánchez, D., Guerrero-Valero, M., Luengo-Gil, G., ... Corbalán-García, S. (2013). Structural insights into the Ca²⁺ and PI(4,5)P₂ binding modes of the C2 domains of rabphilin 3A and synaptotagmin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(51), 20503–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.1316179110>
- Hagler, D. J., & Goda, Y. (2001). Properties of synchronous and asynchronous release during pulse train depression in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, *85*(6), 2324–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11387379>
- Hamilton, P. J., Belovich, A. N., Khelashvili, G., Saunders, C., Erreger, K., Javitch, J. A., ... Galli, A. (2014). PIP₂ regulates psychostimulant behaviors through its interaction with a membrane protein. *Nature Chemical Biology*, *10*(7), 582–9. <http://doi.org/10.1038/nchembio.1545>
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T. C., & Niemann, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *The EMBO Journal*, *13*(21), 5051–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7957071>
- Honigmann, A., van den Bogaart, G., Iraheta, E., Risselada, H. J., Milovanovic, D., Mueller, V., ... Jahn, R. (2013a). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(6), 679–686. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2570>
- Honigmann, A., van den Bogaart, G., Iraheta, E., Risselada, H. J., Milovanovic, D., Mueller, V., ... Jahn, R. (2013b). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(6), 679–686. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2570>
- Hua, Y., Sinha, R., Martineau, M., Kahms, M., & Klingauf, J. (2010). A common origin of synaptic vesicles undergoing evoked and spontaneous fusion. *Nature Neuroscience*, *13*(12), 1451–3. <http://doi.org/10.1038/nn.2695>
- Hui, E., Bai, J., Wang, P., Sugimori, M., Llinas, R. R., & Chapman, E. R. (2005). Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: Candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(14), 5210–5214. <http://doi.org/10.1073/pnas.0500941102>
- Hui, E., Gaffaney, J. D., Wang, Z., Johnson, C. P., Evans, C. S., & Chapman, E. R. (2011). Mechanism and function of synaptotagmin-mediated membrane apposition. *Nature Structural & Molecular Biology*, *18*(7), 813–821. <http://doi.org/10.1038/nsmb.2075>
- Jafferji, S. S., & Michell, R. H. (1976). Investigation of the relationship between cell-surface calcium-ion gating and phosphatidylinositol turnover by comparison of the effects of elevated extracellular potassium ion concentration on ileum smooth muscle and pancreas. *The Biochemical Journal*, *160*(2), 397–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1008862>
- Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012a). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, *490*(7419), 201–207. <http://doi.org/10.1038/nature11320>

Bibliografía

- Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012b). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), 201–7. <http://doi.org/10.1038/nature11320>
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006a). SNAREs — engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 631–643. <http://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Jahn, R., & Scheller, R. H. (2006b). SNAREs — engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(9), 631–643. <http://doi.org/10.1038/nrm2002>
- Janmey, P. A., & Stossel, T. P. (1987). Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature*, 325(6102), 362–364. <http://doi.org/10.1038/325362a0>
- Johnson, J. E., Edwards, A. S., & Newton, A. C. (1997). A putative phosphatidylserine binding motif is not involved in the lipid regulation of protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(49), 30787–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9388219>
- Ke, B., Oh, E., & Thurmond, D. C. (2007). Doc2beta is a novel Munc18c-interacting partner and positive effector of syntaxin 4-mediated exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21786–97. <http://doi.org/10.1074/jbc.M701661200>
- Knopf, J. L., Lee, M. H., Sultzman, L. A., Kriz, R. W., Loomis, C. R., Hewick, R. M., & Bell, R. M. (1986). Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell*, 46(4), 491–502. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3755379>
- Kriz, R., Lin, L. L., Sultzman, L., Ellis, C., Heldin, C. H., Pawson, T., & Knopf, J. (1990). Phospholipase C isozymes: structural and functional similarities. *Ciba Foundation Symposium*, 150, 112–23–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2373024>
- Lacalle, R. A., Peregil, R. M., Albar, J. P., Merino, E., Martínez-A, C., Mérida, I., & Mañes, S. (2007). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase controls neutrophil polarity and directional movement. *The Journal of Cell Biology*, 179(7), 1539–53. <http://doi.org/10.1083/jcb.200705044>
- Lai, A. L., Huang, H., Herrick, D. Z., Epp, N., & Cafiso, D. S. (2011). Synaptotagmin 1 and SNAREs form a complex that is structurally heterogeneous. *Journal of Molecular Biology*, 405(3), 696–706. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.11.015>
- Lemmon, M. A. (2003). Phosphoinositide recognition domains. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 4(4), 201–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694559>
- Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 99–111. <http://doi.org/10.1038/nrm2328>
- Lerman, J. C., Robblee, J., Fairman, R., & Hughson, F. M. (2000). Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A. *Biochemistry*, 39(29), 8470–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913252>
- Li, L., Shin, O.-H., Rhee, J.-S., Araç, D., Rah, J.-C., Rizo, J., ... Rosenmund, C. (2006). Phosphatidylinositol phosphates as co-activators of Ca²⁺ binding to C2 domains of synaptotagmin 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15845–52. <http://doi.org/10.1074/jbc.M600888200>
- Ling, K., Bairstow, S. F., Carbonara, C., Turbin, D. A., Huntsman, D. G., & Anderson, R. A. (2007). Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with mu 1B adaptin. *The Journal of Cell Biology*, 176(3), 343–53. <http://doi.org/10.1083/jcb.200606023>
- Lomasney, J. W., Cheng, H. F., Roffler, S. R., & King, K. (1999). Activation of phospholipase C delta1 through C2 domain by a Ca(2+)-enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21995–2001. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419523>
- Lupyan, D., Mezei, M., Logothetis, D. E., & Osman, R. (2010). A molecular dynamics investigation of lipid bilayer perturbation by PIP2. *Biophysical Journal*, 98(2), 240–7. <http://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.063>

- Mañes, S., Fuentes, G., Peregil, R. M., Rojas, A. M., & Lacalle, R. A. (2010). An isoform-specific PDZ-binding motif targets type I PIP5 kinase beta to the uropod and controls polarization of neutrophil-like HL60 cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(9), 3381–92. <http://doi.org/10.1096/fj.09-153106>
- Marín-Vicente, C., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2005). The ATP-dependent membrane localization of protein kinase Calpha is regulated by Ca²⁺ influx and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in differentiated PC12 cells. *Molecular Biology of the Cell*, 16(6), 2848–61. <http://doi.org/10.1091/mbc.E05-01-0067>
- Marín-Vicente, C., Nicolás, F. E., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2008). The PtdIns(4,5)P₂ Ligand Itself Influences the Localization of PKC α in the Plasma Membrane of Intact Living Cells. *Journal of Molecular Biology*, 377(4), 1038–1052. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.011>
- Martens, S., & McMahon, H. T. (2008). Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7), 543–556. <http://doi.org/10.1038/nrm2417>
- Martin, T. F. J. (2015). PI(4,5)P₂-binding effector proteins for vesicle exocytosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.017>
- McKiernan, C. J., Stabila, P. F., & Macara, I. G. (1996a). Role of the Rab3A-binding domain in targeting of rabphilin-3A to vesicle membranes of PC12 cells. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4985–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756657>
- McKiernan, C. J., Stabila, P. F., & Macara, I. G. (1996b). Role of the Rab3A-binding domain in targeting of rabphilin-3A to vesicle membranes of PC12 cells. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4985–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756657>
- McKiernan, C. J., Stabila, P. F., & Macara, I. G. (1996c). Role of the Rab3A-binding domain in targeting of rabphilin-3A to vesicle membranes of PC12 cells. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4985–95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756657>
- McLaughlin, S., & Murray, D. (2005). Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics. *Nature*, 438(7068), 605–11. <http://doi.org/10.1038/nature04398>
- McLaughlin, S., Wang, J., Gambhir, A., & Murray, D. (2002). PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 31(1), 151–75. <http://doi.org/10.1146/annurev.biophys.31.082901.134259>
- Milosevic, I., Sørensen, J. B., Lang, T., Krauss, M., Nagy, G., Haucke, V., ... Neher, E. (2005). Plasmalemmal Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Level Regulates the Releasable Vesicle Pool Size in Chromaffin Cells. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2557–2565. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3761-04.2005>
- Montaville, P., Coudeville, N., Radhakrishnan, A., Leonov, A., Zweckstetter, M., & Becker, S. (2008). The PIP₂ binding mode of the C2 domains of rabphilin-3A. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 17, 1025–1034. <http://doi.org/10.1110/ps.073326608>
- Montaville, P., Schlicker, C., Leonov, A., Zweckstetter, M., Sheldrick, G. M., & Becker, S. (2007a). The C2A-C2B linker defines the high affinity Ca(2+) binding mode of rabphilin-3A. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 5015–25. <http://doi.org/10.1074/jbc.M606746200>
- Montaville, P., Schlicker, C., Leonov, A., Zweckstetter, M., Sheldrick, G. M., & Becker, S. (2007b). The C2A-C2B linker defines the high affinity Ca(2+) binding mode of rabphilin-3A. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(7), 5015–25. <http://doi.org/10.1074/jbc.M606746200>

Bibliografía

- Murray, D., & Honig, B. (2002). Electrostatic control of the membrane targeting of C2 domains. *Molecular Cell*, 9(1), 145–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804593>
- Nalefski, E. A., & Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: Structural and functional diversity. *Protein Science*, 5(12), 2375–2390. <http://doi.org/10.1002/pro.5560051201>
- Nalefski, E. A., & Falke, J. J. (1998). Location of the membrane-docking face on the Ca²⁺-activated C2 domain of cytosolic phospholipase A2. *Biochemistry*, 37(51), 17642–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922129>
- Nalefski, E. A., Wisner, M. A., Chen, J. Z., Sprang, S. R., Fukuda, M., Mikoshiba, K., & Falke, J. J. (2001). C2 domains from different Ca²⁺ signaling pathways display functional and mechanistic diversity. *Biochemistry*, 40(10), 3089–100. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11258923>
- Neher, E., & Sakaba, T. (2008). Multiple Roles of Calcium Ions in the Regulation of Neurotransmitter Release. *Neuron*, 59(6), 861–872. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.019>
- Ochoa, W. F., Corbalán-García, S., Eritja, R., Rodríguez-Alfaro, J. A., Gómez-Fernández, J. C., Fita, I., & Verdaguer, N. (2002). Additional binding sites for anionic phospholipids and calcium ions in the crystal structures of complexes of the C2 domain of protein kinase calpha. *Journal of Molecular Biology*, 320(2), 277–91. [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00464-3](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00464-3)
- Ochoa, W. F., García-García, J., Fita, I., Corbalán-García, S., Verdaguer, N., & Gómez-Fernández, J. C. (2001). Structure of the C2 domain from novel protein kinase C ϵ . A membrane binding model for Ca²⁺-independent C2 domains. *Journal of Molecular Biology*, 311(4), 837–849. <http://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4910>
- Ono, Y., Kurokawa, T., Kawahara, K., Nishimura, O., Marumoto, R., Igarashi, K., ... Nishizuka, Y. (1986). Cloning of rat brain protein kinase C complementary DNA. *FEBS Letters*, 203(2), 111–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3755404>
- Orita, S., Naito, A., Sakaguchi, G., Maeda, M., Igarashi, H., Sasaki, T., & Takai, Y. (1997). Physical and functional interactions of Doc2 and Munc13 in Ca²⁺-dependent exocytotic machinery. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16081–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9195900>
- Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Komuro, R., Ohtsuka, T., Maeda, M., ... Takai, Y. (1995a). Doc2: A Novel Brain Protein Having Two Repeated C2-like Domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206(2), 439–448. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1062>
- Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Komuro, R., Ohtsuka, T., Maeda, M., ... Takai, Y. (1995b). Doc2: a novel brain protein having two repeated C2-like domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 206(2), 439–48. <http://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1062>
- Ostermeier, C., & Brunger, A. T. (1999a). Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 96(3), 363–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10025402>
- Ostermeier, C., & Brunger, A. T. (1999b). Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell*, 96(3), 363–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10025402>
- Pang, Z. P., Bacaj, T., Yang, X., Zhou, P., Xu, W., & Südhof, T. C. (2011a). Doc2 supports spontaneous synaptic transmission by a Ca²⁺-independent mechanism. *Neuron*, 70(2), 244–51. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.011>
- Pang, Z. P., Bacaj, T., Yang, X., Zhou, P., Xu, W., & Südhof, T. C. (2011b). Doc2 supports

- spontaneous synaptic transmission by a Ca²⁺-independent mechanism. *Neuron*, 70(2), 244–51. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.03.011>
- Pappa, H., Murray-Rust, J., Dekker, L. V., Parker, P. J., & McDonald, N. Q. (1998). Crystal structure of the C2 domain from protein kinase C-delta. *Structure (London, England : 1993)*, 6(7), 885–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687370>
- Park, H., Li, Y., & Tsien, R. W. (2012). Influence of Synaptic Vesicle Position on Release Probability and Exocytotic Fusion Mode. *Science*, 335(6074), 1362–1366. <http://doi.org/10.1126/science.1216937>
- Park, Y., Seo, J. B., Fraind, A., Pérez-Lara, A., Yavuz, H., Han, K., ... Jahn, R. (2015a). Synaptotagmin-1 binds to PIP(2)-containing membrane but not to SNAREs at physiological ionic strength. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(10), 815–23. <http://doi.org/10.1038/nsmb.3097>
- Park, Y., Seo, J. B., Fraind, A., Pérez-Lara, A., Yavuz, H., Han, K., ... Jahn, R. (2015b). Synaptotagmin-1 binds to PIP(2)-containing membrane but not to SNAREs at physiological ionic strength. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(10), 815–23. <http://doi.org/10.1038/nsmb.3097>
- Pérez-Lara, Á., Thapa, A., Nyenhuis, S. B., Nyenhuis, D. A., Halder, P., Tietzel, M., ... Jahn, R. (2016a). PtdInsP₂ and PtdSer cooperate to trap synaptotagmin-1 to the plasma membrane in the presence of calcium. *eLife*, 5. <http://doi.org/10.7554/eLife.15886>
- Pérez-Lara, Á., Thapa, A., Nyenhuis, S. B., Nyenhuis, D. A., Halder, P., Tietzel, M., ... Jahn, R. (2016b). PtdInsP₂ and PtdSer cooperate to trap synaptotagmin-1 to the plasma membrane in the presence of calcium. *eLife*, 5. <http://doi.org/10.7554/eLife.15886>
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., & Südhof, T. C. (1990a). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, 345(6272), 260–263. <http://doi.org/10.1038/345260a0>
- Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., & Südhof, T. C. (1990b). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, 345(6272), 260–263. <http://doi.org/10.1038/345260a0>
- Perisic, O., Fong, S., Lynch, D. E., Bycroft, M., & Williams, R. L. (1998). Crystal structure of a calcium-phospholipid binding domain from cytosolic phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(3), 1596–604. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430701>
- Pinheiro, P. S., de Wit, H., Walter, A. M., Groffen, A. J., Verhage, M., & Sørensen, J. B. (2013). Doc2b synchronizes secretion from chromaffin cells by stimulating fast and inhibiting sustained release. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(42), 16459–70. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2656-13.2013>
- Radhakrishnan, A., Stein, A., Jahn, R., & Fasshauer, D. (2009). The Ca²⁺ Affinity of Synaptotagmin 1 Is Markedly Increased by a Specific Interaction of Its C2B Domain with Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 284(38), 25749–25760. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.042499>
- Radhakrishnan, A., Stein, A., Jahn, R., & Fasshauer, D. (2009). The Ca²⁺ affinity of synaptotagmin 1 is markedly increased by a specific interaction of its C2B domain with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(38), 25749–60. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.042499>
- Rickman, C., Jiménez, J. L., Graham, M. E., Archer, D. A., Soloviev, M., Burgoyne, R. D., & Davletov, B. (2006). Conserved prefusion protein assembly in regulated exocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 17(1), 283–94. <http://doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0620>
- Rizo, J., & Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(7), 665–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18618940>
- Rizo, J., & Südhof, T. C. (1998). C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(26), 15879–82. Retrieved

Bibliografía

- from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632630>
- Rizo, J., & Südhof, T. C. (1998). Mechanics of membrane fusion. *Nature Structural Biology*, 5(10), 839–842. <http://doi.org/10.1038/2280>
- Rizo, J., & Südhof, T. C. (2002). Snares and munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(8), 641–653. <http://doi.org/10.1038/nrn898>
- Rizo, J., & Südhof, T. C. (2012). The Membrane Fusion Enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 Proteins, and Their Accomplices—Guilty as Charged? *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28(1), 279–308. <http://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155818>
- Rizo, J., Ubach, J., García, J., Nittler, M. P., & Südhof, T. C. (1999). Structure of the Janus-faced C2B domain of rabphilin. *Nature Cell Biology*, 1(2), 106–112. <http://doi.org/10.1038/10076>
- Rizo, J., & Xu, J. (2015). The Synaptic Vesicle Release Machinery. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), 339–367. <http://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034057>
- Rizzoli, S. O., & Betz, W. J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(1), 57–69. <http://doi.org/10.1038/nrn1583>
- Rosenmund, C., & Stevens, C. F. (1996). Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, 16(6), 1197–207. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8663996>
- Rothman, J. E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372(6501), 55–63. <http://doi.org/10.1038/372055a0>
- Sørensen, J. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 448(4), 347–62. <http://doi.org/10.1007/s00424-004-1247-8>
- Sánchez-Bautista, S., Marín-Vicente, C., Gómez-Fernández, J. C., & Corbalán-García, S. (2006). The C2 Domain of PKC α Is a Ca $^{2+}$ -dependent PtdIns(4,5)P $_2$ Sensing Domain: A New Insight into an Old Pathway. *Journal of Molecular Biology*, 362(5), 901–914. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.093>
- Sato, M., Mori, Y., Matsui, T., Aoki, R., Oya, M., Yanagihara, Y., ... Tsuboi, T. (2010). Role of the polybasic sequence in the Doc2alpha C2B domain in dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 114(1), 171–81. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06739.x>
- Schekman, R., & Orci, L. (2016). Coat Proteins and Vesicle Budding Published by : American Association for the Advancement of Science Coat Proteins and Vesicle Budding, 271(5255), 1526–1533.
- Schiavo, G., Gu, Q. M., Prestwich, G. D., Söllner, T. H., & Rothman, J. E. (1996). Calcium-dependent switching of the specificity of phosphoinositide binding to synaptotagmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(23), 13327–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8917590>
- Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J. E., & Söllner, T. H. (1997). Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3), 997–1001. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9023371>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <http://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schonn, J.-S., Maximov, A., Lao, Y., Südhof, T. C., & Sørensen, J. B. (2008). Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca $^{2+}$ sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3998–4003. <http://doi.org/10.1073/pnas.0712373105>

- Shao, X., Davletov, B. A., Sutton, R. B., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1996). Bipartite Ca²⁺-binding motif in C2 domains of synaptotagmin and protein kinase C. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5272), 248–51. <http://doi.org/10.1126/science.273.5272.248>
- Shao, X., Fernandez, I., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1998). Solution Structures of the Ca²⁺-free and Ca²⁺-bound C₂A Domain of Synaptotagmin I: Does Ca²⁺ Induce a Conformational Change? †. *Biochemistry*, 37(46), 16106–16115. <http://doi.org/10.1021/bi981789h>
- Shao, X., Li, C., Fernandez, I., Zhang, X., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1997). Synaptotagmin-syntaxin interaction: the C2 domain as a Ca²⁺-dependent electrostatic switch. *Neuron*, 18(1), 133–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010211>
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., ... Takai, Y. (1993a). Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 2061–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384302>
- Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., ... Takai, Y. (1993b). Rabphilin-3A, a putative target protein for smg p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 2061–8. <http://doi.org/10.1128/MCB.13.4.2061>
- Sillitoe, I., Cuff, A. L., Dessailly, B. H., Dawson, N. L., Furnham, N., Lee, D., ... Orengo, C. A. (2013). New functional families (FunFams) in CATH to improve the mapping of conserved functional sites to 3D structures. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D490–D498. <http://doi.org/10.1093/nar/gks1211>
- Smith, R., Klein, P., Koc-Schmitz, Y., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., Brundin, P., ... Li, J.-Y. (2007). Loss of SNAP-25 and rabphilin 3a in sensory-motor cortex in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 0(0), 070630082917008–???. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04703.x>
- Stahl, B., Chou, J. H., Li, C., Südhof, T. C., & Jahn, R. (1996). Rab3 reversibly recruits rabphilin to synaptic vesicles by a mechanism analogous to raf recruitment by ras. *The EMBO Journal*, 15(8), 1799–1809. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617225>
- Stein, A., Radhakrishnan, A., Riedel, D., Fasshauer, D., & Jahn, R. (2007). Synaptotagmin activates membrane fusion through a Ca²⁺-dependent trans interaction with phospholipids. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(10), 904–911. <http://doi.org/10.1038/nsmb1305>
- Stephens, L. R., Jackson, T. R., & Hawkins, P. T. (1993a). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1179(1), 27–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8399352>
- Stephens, L. R., Jackson, T. R., & Hawkins, P. T. (1993b). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1179(1), 27–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8399352>
- Stephens, E. V., Kalinec, G., Brann, M. R., & Gutkind, J. S. (1993). Transforming G protein-coupled receptors transduce potent mitogenic signals in NIH 3T3 cells independent on cAMP inhibition or conventional protein kinase C. *Oncogene*, 8(1), 19–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380916>
- Südhof, T. C. (2004). THE SYNAPTIC VESICLE CYCLE. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 509–547. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Südhof, T. C. (2012). The Presynaptic Active Zone. *Neuron*, 75(1), 11–25. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>
- Südhof, T. C. (2013a). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), 675–690. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
- Südhof, T. C. (2013b). Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a

Bibliografía

- Synaptic Vesicle. *Neuron*, 80(3), 675–690. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
- Sudhof, T. C., & Rothman, J. E. (2009). Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science*, 323(5913), 474–477. <http://doi.org/10.1126/science.1161748>
- Südhof, T. C., Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., & Hofmann, K. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, 388(6642), 593–598. <http://doi.org/10.1038/41580>
- Sutton, R. B., Davletov, B. A., Berghuis, A. M., Südhof, T. C., & Sprang, S. R. (1995). Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell*, 80(6), 929–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7697723>
- Sutton, R. B., Ernst, J. A., & Brunger, A. T. (1999). Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. *The Journal of Cell Biology*, 147(3), 589–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10545502>
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700), 347–53. <http://doi.org/10.1038/26412>
- Sutton, R. B., & Sprang, S. R. (1998). Structure of the protein kinase Cβ phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca²⁺. *Structure (London, England : 1993)*, 6(11), 1395–405. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817842>
- Sutton, R. B., & Sprang, S. R. (1998). Structure of the protein kinase Cβ phospholipid-binding C2 domain complexed with Ca²⁺. *Structure*, 6(11), 1395–1405. [http://doi.org/10.1016/S0969-2126\(98\)00139-7](http://doi.org/10.1016/S0969-2126(98)00139-7)
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., ... Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), 831–46. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.030>
- Tan, M. G. K., Lee, C., Lee, J. H., Francis, P. T., Williams, R. J., Ramírez, M. J., ... Lai, M. K. P. (2014). Decreased rabphilin 3A immunoreactivity in Alzheimer's disease is associated with Aβ burden. *Neurochemistry International*, 64, 29–36. <http://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.013>
- Thapa, N., Sun, Y., Schramm, M., Choi, S., Ling, K., & Anderson, R. A. (2012). Phosphoinositide Signaling Regulates the Exocyst Complex and Polarized Integrin Trafficking in Directionally Migrating Cells. *Developmental Cell*, 22(1), 116–130. <http://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.10.030>
- Torrecillas, A., Laynez, J., Menéndez, M., Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2004a). Calorimetric study of the interaction of the C2 domains of classical protein kinase C isoenzymes with Ca²⁺ and phospholipids. *Biochemistry*, 43(37), 11727–39. <http://doi.org/10.1021/bi0489659>
- Torrecillas, A., Laynez, J., Menéndez, M., Corbalán-García, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2004b). Calorimetric Study of the Interaction of the C2 Domains of Classical Protein Kinase C Isoenzymes with Ca²⁺ and Phospholipids[†]. *Biochemistry*, 43(37), 11727–11739. <http://doi.org/10.1021/bi0489659>
- Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G. A., Ladner, M., ... Koths, K. (1988). Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4886), 1697–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3201259>
- Tsuboi, T., & Fukuda, M. (2005a). The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39253–39259. <http://doi.org/10.1074/jbc.M507173200>
- Tsuboi, T., & Fukuda, M. (2005b). The C2B domain of rabphilin directly interacts with SNAP-25 and regulates the docking step of dense core vesicle exocytosis in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(47), 39253–9.

- <http://doi.org/10.1074/jbc.M507173200>
- Tsuboi, T., Kanno, E., & Fukuda, M. (2007a). The polybasic sequence in the C2B domain of rabphilin is required for the vesicle docking step in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, *100*(3), 770–779. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04266.x>
- Tsuboi, T., Kanno, E., & Fukuda, M. (2007b). The polybasic sequence in the C2B domain of rabphilin is required for the vesicle docking step in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, *100*(3), 770–9. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04266.x>
- Tsuboi, T., Kanno, E., & Fukuda, M. (2007c). The polybasic sequence in the C2B domain of rabphilin is required for the vesicle docking step in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, *100*(3), 770–9. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04266.x>
- Tucker, W. C., Weber, T., & Chapman, E. R. (2004). Reconstitution of Ca²⁺-Regulated Membrane Fusion by Synaptotagmin and SNAREs. *Science*, *304*(5669), 435–438. <http://doi.org/10.1126/science.1097196>
- Ubach, J., García, J., Nittler, M. P., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1999a). Structure of the Janus-faced C 2 B domain of rabphilin. *1*(June).
- Ubach, J., García, J., Nittler, M. P., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1999b). Structure of the Janus-faced C 2 B domain of rabphilin. *Articles 106 NATURE CELL BIOLOGY* *Cellbio.nature.com*, *1*.
- Ubach, J., Zhang, X., Shao, X., Südhof, T. C., & Rizo, J. (1998). Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? *The EMBO Journal*, *17*(14), 3921–30. <http://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3921>
- van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Diederichsen, U., & Jahn, R. (2012). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Increases Ca²⁺ Affinity of Synaptotagmin-1 by 40-fold. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(20), 16447–16453. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.343418>
- van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Diederichsen, U., & Jahn, R. (2012). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate increases Ca²⁺ affinity of synaptotagmin-1 by 40-fold. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(20), 16447–53. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.343418>
- van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Risselada, H. J., Amin, H., Willig, K. I., Hubrich, B. E., ... Jahn, R. (2011a). Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature*, *479*(7374), 552–5. <http://doi.org/10.1038/nature10545>
- van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Risselada, H. J., Amin, H., Willig, K. I., Hubrich, B. E., ... Jahn, R. (2011b). Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature*, *479*(7374), 552–555. <http://doi.org/10.1038/nature10545>
- Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., Ochoa, W. F., Fita, I., & Gómez-Fernández, J. C. (1999). Ca²⁺ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase C α directly to phosphatidylserine. *The EMBO Journal*, *18*(22), 6329–6338. <http://doi.org/10.1093/emboj/18.22.6329>
- Verhage, M., de Vries, K. J., Røshol, H., Burbach, J. P., Gispen, W. H., & Südhof, T. C. (1997). DOC2 proteins in rat brain: complementary distribution and proposed function as vesicular adapter proteins in early stages of secretion. *Neuron*, *18*(3), 453–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115738>
- Walter, A. M., Groffen, A. J., Sørensen, J. B., & Verhage, M. (2011). Multiple Ca²⁺ sensors in secretion: teammates, competitors or autocrats? *Trends in Neurosciences*, *34*(9), 487–497. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2011.07.003>
- Wang, Y., Address, K. J., Chen, J., Geer, L. Y., He, J., He, S., ... Bryant, S. H. (2007). MMDB: annotating protein sequences with Entrez's 3D-structure database. *Nucleic Acids Research*, *35*(Database issue), D298-300. <http://doi.org/10.1093/nar/gkl1952>
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K., & Südhof, T. C. (1997). Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, *388*(6642), 593–8. <http://doi.org/10.1038/41580>
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., ...

Bibliografia

- Rothman, J. E. (1998a). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92(6), 759–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529252>
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., ... Rothman, J. E. (1998b). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*, 92(6), 759–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529252>
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry*, 179(1), 131–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2757186>
- Xu, G.-Y., McDonagh, T., Yu, H.-A., Nalefski, E. A., Clark, J. D., & Cumming, D. A. (1998). Solution structure and membrane interactions of the C2 domain of cytosolic phospholipase A2. *Journal of Molecular Biology*, 280(3), 485–500. <http://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1874>
- Xu, J., Pang, Z. P., Shin, O.-H., & Südhof, T. C. (2009). Synaptotagmin-1 functions as a Ca²⁺ sensor for spontaneous release. *Nature Neuroscience*, 12(6), 759–766. <http://doi.org/10.1038/nn.2320>
- Xue, M., Ma, C., Craig, T. K., Rosenmund, C., & Rizo, J. (2008). The Janus-faced nature of the C(2)B domain is fundamental for synaptotagmin-1 function. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(11), 1160–8. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1508>
- Xue, R., Gaffaney, J. D., & Chapman, E. R. (2015). Structural elements that underlie Doc2 β function during asynchronous synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(31), E4316–E4325. <http://doi.org/10.1073/pnas.1502288112>
- Yao, J., Gaffaney, J. D., Kwon, S. E., & Chapman, E. R. (2011a). Doc2 is a Ca²⁺ sensor required for asynchronous neurotransmitter release. *Cell*, 147(3), 666–77. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.046>
- Yao, J., Gaffaney, J. D., Kwon, S. E., & Chapman, E. R. (2011b). Doc2 is a Ca²⁺ sensor required for asynchronous neurotransmitter release. *Cell*, 147(3), 666–77. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.046>
- Yoshihara, M., & Littleton, J. T. (2002). Synaptotagmin I functions as a calcium sensor to synchronize neurotransmitter release. *Neuron*, 36(5), 897–908. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12467593>
- Zhang, D., & Aravind, L. (2010). Identification of novel families and classification of the C2 domain superfamily elucidate the origin and evolution of membrane targeting activities in eukaryotes. *Gene*, 469(1–2), 18–30. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2010.08.006>
- Zhang, X., Rizo, J., & Südhof, T. C. (1998). Mechanism of Phospholipid Binding by the C₂A-Domain of Synaptotagmin I[†]. *Biochemistry*, 37(36), 12395–12403. <http://doi.org/10.1021/bi9807512>
- Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M., & Wang, X. (2000). Distinct Ca²⁺ binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase dalpha and beta. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19700–6. <http://doi.org/10.1074/jbc.M001945200>
- Zhou, A., Brewer, K. D., & Rizo, J. (2013). Analysis of SNARE complex/synaptotagmin-1 interactions by one-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 52(20), 3446–56. <http://doi.org/10.1021/bi400230u>
- Zhou, Q., Lai, Y., Bacaj, T., Zhao, M., Lyubimov, A. Y., Uervirojnangkoorn, M., ... Brunger, A. T. (2015a). Architecture of the synaptotagmin-SNARE machinery for neuronal exocytosis. *Nature*, 525(7567), 62–7. <http://doi.org/10.1038/nature14975>
- Zhou, Q., Lai, Y., Bacaj, T., Zhao, M., Lyubimov, A. Y., Uervirojnangkoorn, M., ... Brunger, A. T. (2015b). Architecture of the synaptotagmin-SNARE machinery for neuronal exocytosis. *Nature*, 525(7567), 62–67. <http://doi.org/10.1038/nature14975>