

# Mecanismo de Doble Diana de las Proteínas Periféricas de Membrana

Teresa Coronado-Parra y Senena Corbalán-García

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Universidad de Murcia, Spain.

[mtcp2@um.es](mailto:mtcp2@um.es)<sup>1</sup>. [senena@um.es](mailto:senena@um.es)<sup>2</sup>.

## INTRODUCCIÓN

Gran cantidad de funciones celulares dependen de la interacción de proteínas con la superficie interna de la membrana plasmática o de otras membranas intracelulares. Entre otras funciones destacan el tráfico celular, las rutas de señalización y el mantenimiento de la propia estructura celular. (Lemmon, 2008; Moravcevic, Oxley, & Lemmon, 2012). Entre un 30-40% de las proteínas celulares existentes interaccionan con algún tipo de membrana, manifestando así la importancia de las funciones que desempeñan (Arora & Tamm, 2001).

## PROTEÍNAS PERIFÉRICAS DE MEMBRANA

Se definen por tanto las proteínas periféricas de membrana como aquellas proteínas que interaccionan temporalmente con las membranas a través de mecanismos basados en un equilibrio dinámico de las superficies de interacción o modificaciones post-traduccionales como palmitoilaciones, GPI o miristilaciones (Basso, Mendes, & Costa-Filho, 2016). Las proteínas periféricas de membrana interaccionan mediante uniones electrostáticas o puentes de hidrógeno con algunos lípidos o proteínas integrales de membrana. Un ejemplo de este tipo de proteínas sería el citocromo c que interacciona con la superficie de la membrana interna de la mitocondria y que a pH fisiológico es catiónico pudiendo asociarse con fosfatidilserina o fosfatidilglicerol (Van Doren et al, 2017).

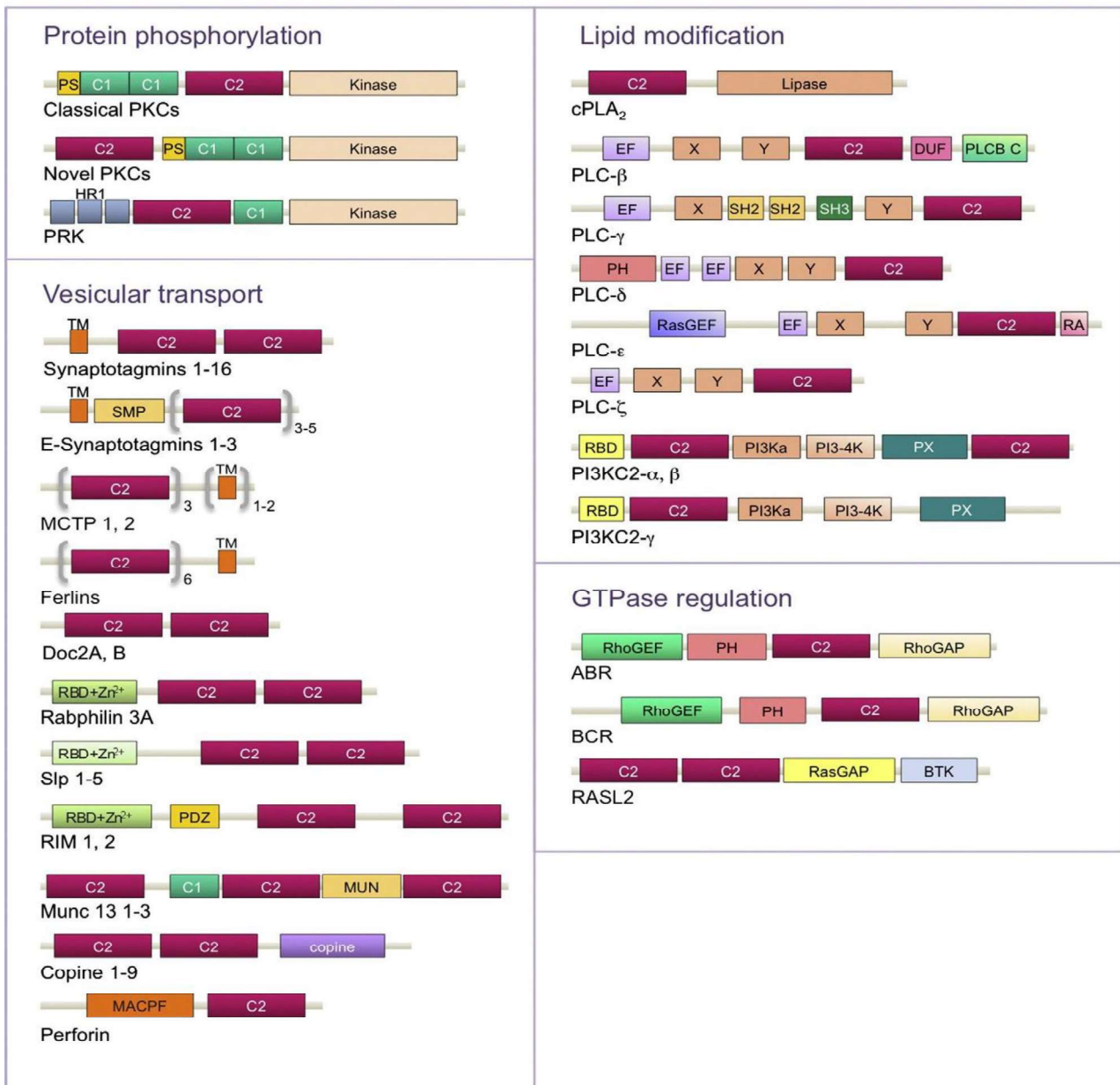
La regulación de la actividad de estas proteínas permite controlar determinadas funciones celulares y evitar el desarrollo de patologías. Igualmente, las proteínas periféricas de membrana, así como sus dominios poseen la capacidad de difundir libremente desde el citosol a las diferentes membranas, ya sea plasmática u otras membranas intracelulares donde realizan su actividad. Dentro de las funciones que ejercen destacamos la modificación de lípidos, la activación de GTPasas o simplemente colocaliza con sus dianas en las rutas de señalización celular (Driscoll & Vuidepot, 1999; Lemmon, 2008). Además, intervienen en otras actividades como la

homeostasis de  $Ca^{2+}$  o la respuesta inflamatoria (García, Lopes, Costa-Filho, Wallace, & Araujo, 2013). También participan en la regulación de las subunidades de los canales iónicos y receptores transmembrana (Stott, Povstyan, Carr, Barrese, & Greenwood, 2015), así como en la regulación de los factores antimicrobianos (Vicente et al., 2013) o de las quinasas entre otras (Hurley, 2006; Vauquelin & Packeu, 2009).

## MECANISMO DE DOBLE DIANA

El mecanismo de interacción de la mayoría de los dominios periféricos de membrana se lleva a cabo con un solo componente de la membrana lo que se traduce en interacciones de baja especificidad y afinidad. Para aumentar la fuerza de este tipo de interacciones los dominios periféricos se asocian con varios componentes de la membrana, pudiendo ser de diferente naturaleza (lípidos u otra proteína) o de la misma (Moravcevic et al., 2012). Así definimos el mecanismo de doble diana de los dominios periféricos de membrana como la capacidad de interaccionar con dos proteínas, dos lípidos de membrana o una proteína y un lípido que poseen estos dominios a utilizando dos regiones distintas en su superficie (Lemmon, 2008).

Las membranas celulares son estructuras dinámicas cuya composición posee más de 1000 tipos diferentes de lípidos en los que se incluye a los fosfoinosítidos que se encargan de generar las señales espaciales y temporales que permiten a las proteínas periféricas ejercer su función. Además, la especificidad de la membrana viene determinada por la carga, curvatura y composición, favoreciendo así un aumento en el número de posibilidades a la hora de generar combinaciones para crear mecanismos de control celular. Estos mecanismos se clasifican en tres tipos: la primera modalidad consiste en interacciones electrostáticas no específicas de superficies básicas de las proteínas, a veces mediadas por cationes como el  $Ca^{2+}$  que producen cambios en la carga electrostática de la superficie proteica para favorecer el acceso a sus lípidos diana cargados negativamente. La segunda modalidad tiene lugar mediante



**Figura 1** | Estructuras de las proteínas incluidas en la familia PFAM / PKC-C2. Las proteínas se han clasificado en cuatro grupos según sus funciones: fosforilación de proteínas, transporte vesicular, modificación de lípidos y regulación de GTPasa. Los paréntesis de la figura indican el número de dominios C2 que posee la proteína mostrada. Abreviaciones: PS, pseudosustrato; PKC, proteína quinasa C; HR1, región 1 de homología de quinasa relacionada con PKC; TM, región transmembrana; SMP, proteína de unión a lípidos mitocondrial similar a sinaptotagmina; MCTP, múltiples proteínas del dominio C2 y de la región transmembrana; DOC2, doble proteína que contiene el dominio similar a C2; Slp, proteína de tipo sinaptotagmina; RIM, molécula que interactúa con Rab3; cPLA2, fosfolipasa A2 citosólica; PLC, fosfolipasa C; EF, motivo de EF-mano; DUF, dominio de función desconocida; SH2, homología de homología 2; SH3, homología de Src, 3; PH, dominio de homología a pleckstrina; FMAM, factor de intercambio de nucleótidos guanina; RA, dominio de asociación ras; RBD, dominio de unión a ras; PX, P40 / 47 dominio de homología phox; GAP, proteína activadora de GTPasa; BTK, tirosina quinasa de Bruton (Corbalán-García, 2014).

la inserción en la bicapa lipídica de una zona hidrofóbica de la proteína. Por último, la tercera modalidad consiste en el reconocimiento específico de la cabeza polar del fosfolípido (Falke & Ziemba, 2014; Kufareva et al., 2014; Stahelin, Scott, & Frick, 2014).

## LOS DOMINIOS C2

Un ejemplo de dominios periféricos de membrana son los dominios C2. Presentan mecanismo de doble diana y son descritos junto con los dominios C1 de la familia de la proteína quinasa C (PKC) como las primeras proteínas periféricas de membrana. Su mecanismo es capaz de responder a diacilglicerol (DAG) y  $Ca^{2+}$  para inducir la localización de la PKC a la membrana plasmática para ejercer su función (Oancea & Meyer, 1998).

Los dominios C2 son módulos independientes de 130 residuos que se encuentran en un gran número de proteínas eucariotas. Estructuralmente estos dominios se definen como miembros de la superfamilia de los dominios C2 que unen  $Ca^{2+}$  y lípidos (CaLB). La clasificación en SCOP está basada en dos topologías diferenciadas en la orientación de las 8 láminas beta en cada uno de los dominios (Senena Corbalan-García & Gómez-Fernández, 2014; Nalefski & Falke, 1996).

Esta superfamilia de dominios C2 está formada por 127 dominios según la base de datos CATH y a nivel funcional se obtiene 80 grupos diferentes. Los dominios C2 se encuentran en una gran variedad de proteínas involucradas en diversas funciones biológicas como fosforilación, modificación de lípidos, transporte de vesículas, regulación de pequeñas GTPasas y la ubiquitinación (Figura 1).

La estructura tridimensional del dominio C2 de la PKC $\alpha$  fue utilizada para el alineamiento de secuencias basado en estructuras (VAST-MMDB). Los resultados mostraron un alto grado de solapamiento con los dominios C2 de otras proteínas como son sinaptotagmina 1, 4, 7 y 13, Rabfilina-3A, PI3K, Piccolo y RIM1 y 2 (S Corbalan-García & Gomez-Fernandez, 2014).

## LA EVOLUCIÓN DE LOS DOMINIOS C2

Un trabajo (Farah & Sossin, 2012) ha estudiado la evolución de las proteínas periféricas de membrana y concretamente los dominios C2 que existen en la familia de las PKC junto a otras dos familias de proteínas donde los dominios C2 se encuentran muy conservados como es el caso de los dominios C2 de Rabfilina-3A y los dominios C2 de las Ras GTPasas.

El análisis filogenético determinó que la familia de las PKC se divide en subfamilias rápidamente a partir de un ancestro común. Parece ser que la capacidad de unir  $Ca^{2+}$  sea una mutación que da lugar a otra rama de la que provienen los dominios C2 de Rabfilina-3A, la subfamilia de PKC clásicas y las Ras GTPasas. Siendo la capacidad de unir  $Ca^{2+}$  una característica común que no estaba presente en el ancestro más antiguo que sea la diferencia que separa estos grandes grupos (Farah & Sossin, 2012). Sin embargo, los análisis filogenéticos de Zhang y Aravind realizados con las estructuras apuntan que dentro de las funciones ancestrales se encontraba la unión a  $Ca^{2+}$ . Se considera la pérdida de la capacidad de unión como un suceso más moderno en la evolución de los dominios (Zhang & Aravind, 2010).

El alto grado de solapamiento de las estructuras de los dominios C2 de la familia PKC con los de Rabfilina-3A y los resultados del análisis filogenético que sugieren una estrecha evolución de ambas nos sugirió ampliar los conocimientos adquiridos en los estudios previos en la familia de PKC a través de los dominios C2 a los dominios de Rabfilina-3A.

## LOS DOMINIOS C2 EN LAS PKCs

Nishizuka y sus colaboradores identifican hace 40 años esta familia de proteínas PKC, como proteínas dependientes de fosfolípidos y que se activan por  $Ca^{2+}$  (Inoue, Kishimoto, Takai, & Nishizuka, 1977; Nakamura & Yamamura, 2010). Blumberg y sus colaboradores determinaron que estas proteínas actuaban como receptores celulares para los esteroides de forbol. Poseen más de 60.000 citas PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y 10.000 citas en particular que asocian el cáncer con esta familia de proteínas, convirtiéndose así en una de las familias de quinasas más estudiada (Castagna et al., 1982; Cooke, Magimaidas, Casado-Medrano, & Kazanietz, 2017; Driedger & Blumberg, 1980; Sharkey, Leach, & Blumberg, 1984).

La familia PKC representa el 2% del quinoma humano y consta de 10 isoenzimas que son codificadas por 9 genes en mamíferos. Son enzimas con actividad fosfotransferasa que fosforilan específicamente residuos Ser/Thr en las proteínas diana y son cruciales en la señalización celular (Fig.2). Se encuentran implicadas en una enorme variedad de funciones fisiológicas como la proliferación celular, regulación del metabolismo, apoptosis, activación de plaquetas, reorganización del citoesqueleto de actina, regulación de los canales iónicos, diferenciación neural y además se encuentran implicadas en una gran variedad de patologías como son el cáncer o enfermedades del corazón

y pulmón (Cooke et al., 2017; Corbalán-García & Gómez-Fernández, 2006; Urtreger, Kazanietz, & Bal De Kier Joffé, 2012).

**LOS DOMINIOS C2 DE RABFILINA-3A**

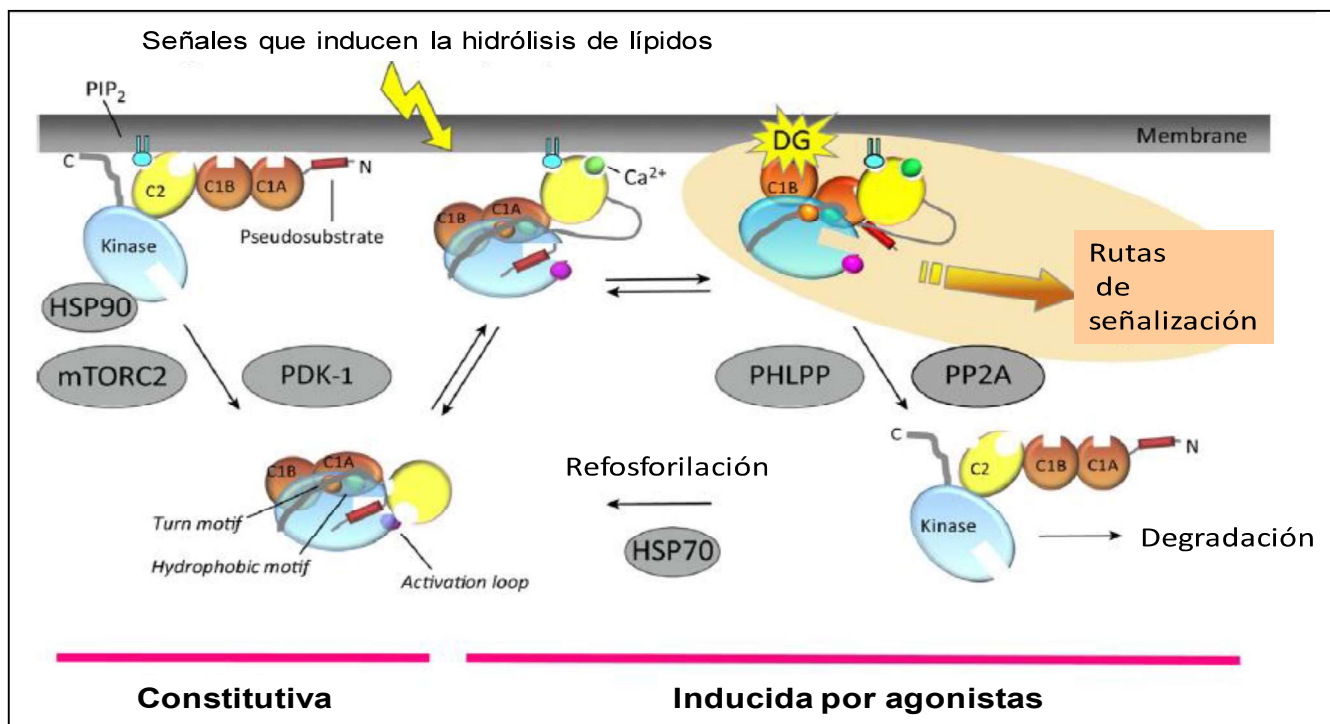
Los dominios C2 pueden encontrarse involucrados en el tráfico y fusión de membranas. Este tipo de procesos resultan esenciales para un amplio grupo de funciones celulares como es por ejemplo la comunicación neuronal (Jahn & Fasshauer, 2012). Las neuronas son capaces de relacionarse mediante la liberación de neurotransmisores a través de la sinapsis y para ello requieren la implicación de un gran número de proteínas que regulen este mecanismo (Xie et al., 2017).

Existen más proteínas que participan en este proceso y que a su vez comparten dominios C2 en sus estructuras, siendo este contexto celular otro ejemplo del mecanismo de doble diana. Los dominios regulan mediante la unión a Ca<sup>2+</sup>, a fosfolípidos y la interacción con otras proteínas el complicado mecanismo que supone la liberación de vesículas sinápticas (Südhof, 2012).

La familia de proteínas efectoras de Rab27 posee una clara presencia de dominios C2 en sus estructuras en la mayoría de los casos (Izumi, 2007). Una de las proteínas implicadas en la liberación de vesículas, que posee dominios C2 en su estructura y que presenta un alto grado de solapamiento con la estructura 3D del C2 de PKCα es Rabfilina-3A. Está vinculada a la regulación dependiente de Ca<sup>2+</sup> en la exocitosis de vesículas secretoras de neuronas y células endocrinas, aunque su función exacta es a día de hoy tema de debate (Fukuda, Kanno, & Yamamoto, 2004; Xie et al., 2017).

**EL PAPEL DE LOS DOMINIOS C2 EN DETERMINADAS ENFERMEDADES**

En los estudios realizados en esta tesis doctoral se ha abordado el papel de los dominios C2 en dos áreas diferentes como son el cáncer de mama y la caracterización del proceso de fusión de membranas. Debido a los trabajos previos de nuestro grupo de Biomembranas de la Universidad de Murcia se ha centrado el estudio del papel de **los dominios C2-PKC en el desarrollo de nuevas terapias para el cáncer de mama.**



**Figura 2 | Esquema del proceso de activación de las PKC.** El dominio C2 une a Ca<sup>2+</sup> citosólico en el estado inactivo de las PKC. Ahora el C2 se une a la membrana a través de la PS tirando de los dominios C1 separándolos del dominio catalítico. El dominio C1A une a DAG tirando ahora del dominio pseudo-sustrato dejando libre el sitio activo y como consecuencia activando las PKC (Newton & Brognard, 2017).



Ha sido ampliamente documentado el papel de la PKC $\alpha$  en el crecimiento de tumores y su implicación en la progresión de los mismos a pesar de poseer un papel dual general en el cáncer, siendo promotor y a veces supresor tumoral (Griner & Kazanietz, 2007; Kang, 2014; Newton & Brognard, 2017). Particularmente en el cáncer de mama se ha establecido que la sobreexpresión de PKC $\alpha$  confiere un fenotipo más agresivo y resistencia a la quimioterapia en aquellas líneas celulares ER positivas y además presentan elevados niveles de PKC $\alpha$ .

Uno de los avances más importantes en medicina ha sido el estudio del perfil de expresión génica de células y tejidos. Esto ha permitido analizar los cambios que ocurren en patologías como el cáncer de mama estudiado en esta tesis doctoral. Tras comprobar el papel clave de PKC $\alpha$  en esta patología, se decidió utilizar este tipo de estudios en una línea celular modelo de cáncer de mama como es MCF-7. Se validaron los resultados obtenidos de los análisis de transcriptómica (microarray) mediante qPCR. Gracias a estos estudios se diseñó una terapia combinada basada en los cambios observados en el perfil génico tras la inhibición de PKC $\alpha$ . Terapia que fue validada mediante ensayos de proliferación celular, capacidad de migración celular y apoptosis o muerte celular programada. Además, se realizó un estudio de los cambios registrados en el perfil de fosforilación en esta línea celular al inhibir la expresión de PKC $\alpha$ , dejando clara su posición estratégica en este tipo de patologías.

La otra área de interés abordada en los estudios de esta tesis doctoral trata de averiguar el **papel de Rabfilina-3A en la fusión de membranas**. La fusión de membranas es un proceso que tiene lugar en la mayoría de las células eucariotas y resulta indispensable para la liberación de los neurotransmisores en los terminales sinápticos mediante la exocitosis de las vesículas sinápticas. Este proceso está catalizado por el complejo SNARE (acrónimo inglés Soluble NSF Attachment Receptor). Está compuesto por las proteínas syntaxina 1 y SNAP25 y sinaptobrevina (Deák, Shin, Kavalali, & Südhof, 2006).

Gran cantidad de las proteínas que forman parte de la liberación de los neurotransmisores comparten en su estructura los dominios C2. Estos dominios periféricos de membrana y su mecanismo de doble diana consiguen regular de forma muy precisa la liberación vesicular. Particularmente mediante la unión a Ca<sup>2+</sup>, fosfolípidos y a otras proteínas generan diferentes modos de regulación para el control de este proceso.

En la literatura se ha descrito que Rabfilina-3A interacciona con rabaptatina-5 (proteína efectora de Rab5)

que interviene en la regulación de la endocitosis. Esta interacción se inhibe en presencia de Rab3a, pudiendo así Rabfilina-3A tener otro papel en la regulación del proceso endocítico y posteriormente participar en la exocitosis mediante su interacción con Rab3. Aún no existe consenso sobre el mecanismo en el que Rabfilina-3A interviene en la regulación de la exocitosis (Coppola et al., 2001; Izumi, 2007; Ohya, Sasaki, Kato, & Takai, 1998). Estudios actuales han mostrado que Rabfilina-3A interacciona con el receptor del dominio NMDA (N-metil-D-aspartato) a través de su dominio N-terminal, implicándola así en las neuronas postsinápticas (Stanic et al., 2015).

La pérdida de Rabfilina-3A se asocia a enfermedades como el Alzheimer debido a la disfunción del complejo SNARE en las neuronas que resultan afectadas con un incremento de la proteína  $\beta$ -amiloide y a otras patologías como la enfermedad de Huntington, donde se ha descrito una disminución en los niveles de Rabfilina-3A y SNAP25 en el córtex de estos pacientes con la posterior influencia en la regulación de la liberación de neurotransmisores (Smith et al., 2007; Tan et al., 2014).

Nuestro grupo de investigación en colaboración con el IBMB-CSIC ha determinado las estructuras cristalinas de los complejos formados por el dominio C2B de Rabfilina-3A con SNAP25 y el dominio C2B de Rabfilina-3A con fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) (Ferrer-Orta et al., 2017). En esta tesis doctoral se ha trabajado en desvelar el mecanismo molecular que media la interacción de Rabfilina-3A con SNAP25. Se realizó una caracterización biofísica, bioquímica y estudios en línea celular.

## CONCLUSIONES

Los dominios C2 son un ejemplo de dominios periféricos de membrana que poseen mecanismo de doble diana interaccionando con Ca<sup>2+</sup>, fosfolípidos de membrana y con otras proteínas.

Los estudios realizados con dos ejemplos de proteínas que poseen el dominio regulador C2 en su estructura, la isoforma clásica PKC $\alpha$  y la proteína Rabfilina-3A, contribuye a ampliar el conocimiento acerca del mecanismo molecular que tiene lugar en dos contextos celulares diferentes, así como constatar que la isoforma clásica PKC $\alpha$  posee un papel clave en el diseño de nuevas terapias para el cáncer de mama.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arora, A., & Tamm, L. K. (2001). Biophysical approaches to membrane protein structure determination. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5), 540–547.

Basso, L. G. M., Mendes, L. F. S., & Costa-Filho, A. J. (2016). The two sides of a lipid-protein story. *Biophysical Reviews*, 8(2), 179–191. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0199-5>

Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., & Nishizuka, Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(13), 7847–7851.

Cooke, M., Magimaidas, A., Casado-Medrano, V., & Kazanietz, M. G. (2017). Protein kinase C in cancer: The top five unanswered questions. *Molecular Carcinogenesis*, (January). <https://doi.org/10.1002/mc.22617>

Coppola, T., Hirling, H., Perret-Menoud, V., Gattesco, S., Catsicas, S., Joberty, G., ... Regazzi, R. (2001). Rabphilin dissociated from Rab3 promotes endocytosis through interaction with Rabaptin-5. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 9), 1757–1764.

Corbalan-Garcia, S., & Gomez-Fernandez, J. C. (2014). Classical protein kinases C are regulated by concerted interaction with lipids: the importance of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Biophys. Rev.*, 6(1), 3–14. <https://doi.org/10.1007/s12551-013-0125-z>

Corbalan-Garcia, S., & Gómez-Fernández, J. C. (2014). Signaling through C2 domains: More than one lipid target ☆. *BBA - Biomembranes*, 1838, 1536–1547. <https://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*, 1761(7), 633–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.04.015>

Deák, F., Shin, O.-H., Kavalali, E. T., & Südhof, T. C. (2006). Cellular/Molecular Structural Determinants of Synaptobrevin 2 Function in Synaptic Vesicle Fusion. *Journal of Neuroscience*, 26(25), 6668–6676. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5272-05.2006>

Driedger, P. E., & Blumberg, P. M. (1980). Specific binding of phorbol ester tumor promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(1), 567–571.

Driscoll, P. C., & Vuidepot, A. L. (1999). Peripheral membrane proteins: FYVE sticky fingers. *Current Biology : CB*, 9(22), R857–60.

Falke, J. J., & Ziemba, B. P. (2014). Interplay between phosphoinositide lipids and calcium signals at the leading edge of chemotaxing amoeboid cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, 182, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.01.002>

Farah, C. A., & Sossin, W. S. (2012). The role of C2 domains in PKC signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2\\_29](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_29)

Ferrer-Orta, C., Pérez-Sánchez, M. D., Coronado-Parra, T., Silva, C., López-Martínez, D., Baltanás-Copado, J., ... Verdaguer, N. (2017). Structural characterization of the Rabphilin-3A-SNAP25 interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1702542114>

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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306812200>

Garcia, A. F., Lopes, J. L. S., Costa-Filho, A. J., Wallace, B. A., & Araujo, A. P. U. (2013). Membrane Interactions of S100A12 (Calgranulin C). *PLoS ONE*, 8(12), e82555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082555>

Griner, E. M., & Kazanietz, M. G. (2007). Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 281–294. <https://doi.org/10.1038/nrc2110>

Hurley, J. (2006). Membrane binding domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761(8), 805–811. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.02.020>

Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., & Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(21), 7610–7616.

Izumi, T. (2007). Physiological Roles of Rab27 Effectors in Regulated Exocytosis. *Endocrine Journal/Endocrine Journal*, 54(54), 649–657.

Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), 201–207. <https://doi.org/10.1038/nature11320>

Kang, J.-H. (2014). Protein Kinase C (PKC) isozymes and cancer. *New Journal of Science*, 2014, 168–173. <https://doi.org/10.1155/2014/231418>

Kufareva, I., Lenoir, M., Dancea, F., Sridhar, P., Raush, E., Bissig, C., ... Overduin, M. (2014). Discovery of novel membrane binding structures and functions. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 92(6), 555–563. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0074>

Lemmon, M. A. (2008). Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 99–111. <https://doi.org/10.1038/nrm2328>

Moravcevic, K., Oxley, C. L., & Lemmon, M. A. (2012). Conditional Peripheral Membrane Proteins: Facing up to Limited Specificity. *Structure*, 20(1), 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.11.012>

Nakamura, S. -, & Yamamura, H. (2010). Yasutomi Nishizuka: Father of protein kinase C. *Journal of Biochemistry*, 148(2), 125–130. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq066>

Nalefski, E. A., & Falke, J. J. (1996). The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 5(12), 2375–2390. <https://doi.org/10.1002/pro.5560051201>

Newton, A. C., & Brognard, J. (2017). Reversing the Paradigm: Protein Kinase C as a Tumor Suppressor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38(5), 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.02.002>

Oancea, E., & Meyer, T. (1998). Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*, 95(3), 307–318.

Ohya, T., Sasaki, T., Kato, M., & Takai, Y. (1998). Involvement of Rabphilin3 in endocytosis through interaction with Rabaptin5. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(1), 613–617.

Sharkey, N. A., Leach, K. L., & Blumberg, P. M. (1984). Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(2), 607–610.

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–??? <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04703.x>

Stahelin, R. V., Scott, J. L., & Frick, C. T. (2014). Cellular and Molecular Interaction of Phosphoinositides and Peripheral Proteins. *Chem Phys Lipids*, *182*(3), 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.02.002>

Stanic, J., Carta, M., Eberini, I., Pelucchi, S., Marcello, E., Genazzani, A. A., ... Gardoni, F. (2015). Rabphilin 3A retains NMDA receptors at synaptic sites through interaction with GluN2A/PSD-95 complex. *Nature Communications*, *6*, 10181. <https://doi.org/10.1038/ncomms10181>

Stott, J. B., Povstyan, O. V., Carr, G., Barrese, V., & Greenwood, I. A. (2015). G-protein  $\beta\gamma$  subunits are positive regulators of Kv7.4 and native vascular Kv7 channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(20), 6497–6502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418605112>

Südhof, T. C. (2012). The Presynaptic Active Zone. *Neuron*, *75*(1), 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>

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 A $\beta$  burden. *Neurochemistry International*, *64*, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.10.013>

Urtreger, A. J., Kazanietz, M. G., & Bal De Kier Joffé, E. D. (2012). Contribution of individual PKC isoforms to breast cancer progression. *IUBMB Life*, *64*(1), 18–26. <https://doi.org/10.1002/iub.574>

Vauquelin, G., & Packeu, A. (2009). Ligands, their receptors and ... plasma membranes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *311*(1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.022>

Vicente, E. F., Basso, L. G. M., Cespedes, G. F., Lorenzón, E. N., Castro, M. S., Mendes-Giannini, M. J. S., ... Cilli, E. M. (2013). Dynamics and conformational studies of TOAC spin labeled analogues of Ctx(Ile(21))-Ha peptide from *Hypsiboas albopunctatus*. *PLoS One*, *8*(4), e60818. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060818>

Xie, Z., Long, J., Liu, J., Chai, Z., Kang, X., & Wang, C. (2017). Molecular Mechanisms for the Coupling of Endocytosis to Exocytosis in Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*, 47. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00047>

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. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.08.006>