



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

RIC-8: un nuevo GEF con estructura tipo “armadillo”

Profesor Tutor: Juan Olate Aravena
Profesor co-Tutor: José Martínez Oyanedel
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Tesis para ser presentada a la Dirección de Postgrado de la
Universidad de Concepción

MAXIMILIANO FRANCISCO FIGUEROA YÉVENES
CONCEPCIÓN-CHILE
2010

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Juan Olate A.
Profesor tutor de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. José Martínez O.
Profesor co-tutor de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Nelson Carvajal B.
Profesor Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Juan Carlos Vera C.
Profesor Evaluador Interno
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Octavio Monasterio O.
Profesor Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dr. Carlos Opazo M.
Director
Programa Doctorado en Ciencias
Biológicas Área Biología Celular y
Molecular

ÍNDICE

	página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
AGRADECIMIENTOS	x
RESUMEN	xi
SUMMARY	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.-Mecanismo de activación y desactivación de proteínas G heterotriméricas	1
2.- RIC-8 como proteína GEF para proteínas heterotriméricas.....	4
3.- Características funcionales y estructurales de RIC-8.....	7
4.- Herramientas bioinformáticas para el estudio estructural de RIC-8.....	9
5.- Contexto general del presente trabajo de estudio.....	11
II. HIPÓTESIS	13
III. OBJETIVOS	13
1.- Objetivo general.....	13
2.- Objetivos específicos.....	13
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	14
IV.1 MATERIALES	14
1.- Reactivos y soluciones generales.....	14
2.- Herramientas bioinformáticas.....	15
2.1.- Análisis de estructura primaria.....	15
2.2.- Predicción de estructura secundaria.....	16
2.3.- Reconocimiento de plegamiento.....	16
2.4.- Construcción de modelo 3D para xRIC-8.....	16
3.- Vectores de expresión.....	17
4.- Enzimas.....	17
5.- Anticuerpos.....	17
6.- Oligonucleótidos.....	18

7.- Cepas Bacterianas.....	18
8.- Línea celular.....	18
9.- Medios de cultivo.....	18
10.- Purificación de proteínas.....	19
11.- Dicroísmo circular.....	20
12.- Fluorescencia.....	20
13.- Medición de AMPc intracelular.....	20
14.- Microscopía confocal.....	21
IV.2 MÉTODOS.....	21
1.- Técnicas de uso general.....	21
1.1.- Preparación de bacterias químicamente competentes.....	21
1.2.- Preparación de bacterias electro competentes.....	22
1.3.- Purificación de plásmidos por la técnica de polietilenglicol (PEG)..	22
1.4.- Purificación de plásmidos mediante el kit MIDI prep.....	24
1.5.- Purificación de plásmidos por la técnica de Mini Lisado.....	24
1.6.- Extracción de ADN desde gel de agarosa.....	25
1.7.- Transformación bacteriana por el método químico.....	25
1.8.- Transformación bacteriana por el método de electroporación.....	26
1.9.- Electroforesis SDS-PAGE.....	26
1.10.- Análisis de “eestern blot”.....	27
1.11.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
1.12.- Digestión analítica de ADN plasmidial.....	29
1.13.- Digestión preparativa de ADN plasmidial.....	29
1.14.- Desfosforilación de ADN plasmidial previamente digerido.....	30
1.15.- Transfección celular.....	30
2.- Análisis bioinformático de la proteína xRIC-8.....	31
2.1.- BLAST y búsqueda de dominios (SMART e InterProScan).....	31
2.2.- Alineamiento múltiple de secuencias.....	32
2.3.- Predicción de estructura secundaria.....	32
2.4.- Reconocimiento de plegamiento.....	32
2.5.- Construcción de modelo 3D para xRIC-8.....	32
2.6.- Cálculo de potencial electrostático de superficie.....	33

3.- Expresión, purificación y caracterización de xRIC-8 y diferentes regiones de la proteína.....	33
3.1.- Expresión y purificación de xRIC-8.....	33
3.2.- Caracterización estructural de xRIC-8 mediante dicroísmo circular.....	35
3.3.- Diseño de las mutantes de delección de xRIC-8.....	36
3.4.- Expresión y purificación de las mutantes de delección de xRIC-8.....	36
3.5.- Caracterización estructural de las mutantes de delección mediante dicroísmo circular.....	37
4.- Análisis de la actividad GEF de xRIC-8 y de diferentes regiones de la proteína.....	37
4.1.- Expresión y purificación de G α s.....	37
4.2.- Análisis de la actividad GEF <i>in vitro</i> por fluorescencia de triptófanos.....	38
4.3.- Análisis de la actividad GEF <i>in vitro</i> por fluorescencia de GTP- γ -S-BODIPY®.....	38
4.4.- Análisis de la actividad GEF <i>in vivo</i> por la activación de un gen reportero sensible a AMPc.....	39
4.5.- Análisis de la actividad GEF <i>in vivo</i> por el aumento de la concentración intracelular de AMPc.....	39
4.6.- Estudio de la translocación de xRIC-8 y mutantes de delección a la membrana plasmática.....	40
V. RESULTADOS.....	42
V.1.- Análisis bioinformático de la proteína xRIC-8.....	42
1.- Búsqueda de dominios, motivos y predicción de estructura secundaria.....	42
2.- Reconocimiento de plegamiento.....	46
3.- Construcción de modelo 3D para xRIC-8.....	49
V.2.- Expresión, purificación y caracterización de xRIC-8 y diferentes regiones de la proteína.....	55
1.- Expresión de xRIC-8.....	55
2.- Purificación de xRIC-8.....	56
3.- Caracterización estructural de xRIC-8 mediante dicroísmo circular.....	62

4.- Diseño de mutantes de delección de xRIC-8.....	64
5.- Expresión y purificación de las mutantes de delección de xRIC-8.....	67
6.- Caracterización estructural de las mutantes de delección mediante dicroísmo circular.....	67
V.3.- Análisis de la actividad GEF de xRIC-8 y de diferentes regiones de la proteína.....	70
1.- Análisis de la actividad GEF <i>in vitro</i> por fluorescencia de triptófanos.....	70
2.- Análisis de la actividad GEF <i>in vitro</i> por fluorescencia de GTP- γ -S-BODIPY®.....	72
3.- Análisis de la actividad GEF <i>in vivo</i> por la activación de un gen reportero sensible a AMPc.....	72
4.- Análisis de la actividad GEF <i>in vivo</i> por el aumento de la concentración intracelular de AMPc.....	76
5.- Estudio de translocación de xRIC-8 y mutantes de delección a la membrana plasmática.....	78
VI. DISCUSIÓN.....	82
VII. CONCLUSIONES.....	97
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	98
IX. ANEXOS.....	103
IX.1.- Publicaciones.....	103
1.- Publicación generada a partir de la Tesis Doctoral.....	103
2.- Otras publicaciones generadas durante la permanencia en el Programa de Doctorado.....	103
IX.2.- Presentaciones a congresos durante la permanencia en el programa de doctorado	104
1.- Congresos internacionales.....	104
2.- Congresos nacionales.....	105

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de activación y desactivación de proteínas G heterotriméricas.....	2
Figura 2. Distintos tipos de plegamiento presentes en diferentes proteínas con actividad GEF...	3
Figura 3. Mecanismo de acción GEF para RIC-8.....	6
Figura 4. Predicción de estructura secundaria para xRIC-8.....	44
Figura 5. Alineamiento múltiple entre distintas proteínas RIC-8.....	45
Figura 6. Dominio Armadillo.....	48
Figura 7. Evaluación de modelos 3D para xRIC-8 generados con iTasser y Modeller usando software ProSA II.....	50
Figura 8. Modelo 3D de xRIC-8.....	52
Figura 9. Representación de potencial electrostático de superficie de xRIC-8.....	53
Figura 10. Gráfico de Ramachandran para modelo 3D de xRIC-8.....	54
Figura 11. Estandarización de las condiciones de expresión de xRIC-8 en bacterias <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	57
Figura 12. Análisis de las fracciones eluidas desde cromatografía IMAC de xRIC-8.....	59
Figura 13. Cromatograma de la elusión de xRIC-8 desde columna HiLoadQ.....	60
Figura 14. Análisis SDS-PAGE y “western blot” de las fracciones eluidas desde la columna HiLoad Q.....	61
Figura 15. Espectro de dicroísmo circular y curva de denaturación térmica de xRIC-8.....	63
Figura 16. Representación esquemática de los dominios armadillo en xRIC-8 para diseño de mutantes de delección.....	65
Figura 17. Subclonamiento de las mutantes de delección.....	66
Figura 18. Análisis de fracciones eluidas desde cromatografía IMAC para xRIC-8 y mutantes de delección.....	68
Figura 19. Espectro de dicroísmo circular y curva de termo estabilidad de mutante de delección ΔH	69
Figura 20. Análisis SDS-PAGE de la purificación de $G\alpha s$	71
Figura 21. Medición de la actividad GEF <i>in vitro</i> de xRIC-8 sobre $G\alpha s$ mediante técnicas de fluorescencia.....	73
Figura 22. Medición de la Actividad GEF a través de gen reportero luciferasa.....	75

Figura 23. Medición indirecta de actividad GEF mediante cuantificación de AMPc intracelular.....	77
Figura 24. Estudio de translocación de xRIC-8 y mutantes de delección a membrana plasmática inducido por isoproterenol.....	80
Figura 25. Co-inmuno precipitación de xRIC-8 o mutantes de delección con G α s.....	81
Figura 26. Esquema de acción de xRIC-8 <i>in vivo</i>	95

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Análisis de BLAST usando secuencia de xRIC-8.....	43
Tabla II. Reconocimiento de plegamiento para xRIC-8.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPc:** Adenosin 3',5' monofosfato cíclico
- BLAST:** Herramienta de búsqueda de alineamiento local básico
- DC:** Dicroísmo circular
- dNTP:** Desoxirribonucleótidos trifosfatos
- FBS:** Suero bovino fetal
- FPLC:** Cromatografía líquida de baja presión
- GDI:** Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina
- GDP:** Guanosina 5'-difosfato
- GEF:** Factor intercambiador de nucleótidos de guanina
- GPCR:** Receptor acoplado a proteína G
- GTP:** Guanosina 5'-trifosfato
- HRP:** Enzima peroxidasa de rábano
- IPTG:** Isopropil- β -D-tio-galactopiranosido
- λ : Longitud de onda
- λ^{exi} : Longitud de onda de excitación
- λ^{emi} : Longitud de onda de emisión
- MRE:** Elipticidad molar residuo medio
- PBS:** Amortiguador fosfato salino
- PMSF:** Fluoruro de metilfenilsulfonilo
- θ : Elipticidad
- RIC-8:** Resistencia a inhibidores de colinesterasa, clon 8
- SDS:** Dodecil sulfato de sodio

TBS: Amortiguador Salino Tris

TE: Amortiguador Tris-HCl – EDTA

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONICYT por financiar mis estudios doctorales durante el período 2005-2009 a través de su programa de capital humano avanzado “Becas de doctorado nacional”, además de financiar mi estadía de 3 meses en la Universidad de California en San Francisco, EE.UU., a través de su programa de “Becas de estadías cortas en el extranjero por gestión propia”.

Igualmente agradezco a la Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción por su apoyo durante los años de permanencia en el programa en todo lo que respecta a asistencia a congresos, así como también a becas de arancel.

De igual modo, deseo expresar mis agradecimientos a mis profesores tutores por darme la oportunidad de desarrollar esta tesis.

RESUMEN

RIC-8 es una proteína altamente conservada (63 Kda) e identificada inicialmente en *C. elegans* como un factor esencial en la liberación de neurotransmisores y en la división asimétrica. Dos isoformas han sido descritas en mamíferos, RIC-8A y RIC-8B; y cada una posee actividad intercambiadora de nucleótidos (GEF) sobre proteínas G heterotriméricas, pero con diferente especificidad de subunidad $G\alpha$. Para llegar a comprender el mecanismo involucrado en las funciones celulares de RIC-8 es esencial obtener alguna información acerca de su estructura. De este modo, el objetivo de esta tesis es estudiar la relación entre la estructura y la función de RIC-8, usando como modelo de estudio RIC-8 de *X. laevis*. Un análisis de su estructura primaria no entregan información acerca de la función de xRIC-8, y las proteínas RIC-8 mostraron ser una familia única sin similitud con otras proteínas. Por esta razón, para obtener un modelo 3D de xRIC-8 se usaron diferentes aproximaciones bioinformáticas, incluyendo predicción de plegamientos. El modelo 3D propuesto para xRIC-8 presenta 10 dominios armadillo en tandem, organizados en una estructura super helicoidal de giro a la derecha. Para sustentar experimentalmente el modelo, xRIC-8 fue expresada en *E. coli* y purificada por cromatografía de afinidad e intercambio iónico, para luego ser analizada mediante dicroísmo circular (CD) y estudios de termo estabilidad. Utilizando el modelo propuesto y la información obtenida al comparar las proteínas RIC-8 entre sí, la cual muestra una alta conservación hacia la región carboxilo, se crearon mutantes de delección que eliminan los 3 últimos dominios armadillos en búsqueda de una pérdida de función GEF. Las mutantes no pudieron ser expresadas en bacterias para estudios *in vitro*, pero su expresión en cultivos celulares mostraron que todas ellas conservaron su actividad GEF. Estudios de microscopía confocal mostraron que todas las mutantes translocan a la membrana plasmática bajo el estímulo de isoproterenol, y tienen la capacidad de interactuar con $G\alpha$ s. Los resultados de esta tesis han permitido generar el primer

modelo 3D para una proteína RIC-8, así como también clasificar a RIC-8 como un nuevo miembro de la familia de proteínas con repeticiones armadillo. Funcionalmente, la región carboxilo terminal, la más conservada entre RIC-8, no mostró albergar la actividad GEF, ni alterar su comportamiento en cultivos de células HEK293T al ser estimuladas con isoproterenol.

SUMMARY

RIC-8 is a highly conserved cytosolic protein (63 KDa) initially identified in *C. elegans* as an essential factor in neurotransmitter release and asymmetric cell division. Two different isoforms have been described in mammals, RIC-8A and RIC-8B; each possess guanine nucleotide exchange activity (GEF) on heterotrimeric G-proteins, but with different G α subunits specificities. To gain insight on the mechanisms involved in RIC-8 cellular functions it is essential to obtain some information about its structure. Therefore, the aim of this thesis was to study the relationship between structure and function on RIC-8, using as model RIC-8 from *X. laevis*. Analysis in its primary structure did not give us information about the function of xRIC-8 and RIC-8 proteins were showed as a single family without similarity with others. For this reason, to obtain a 3D model of xRIC-8, different bioinformatics approaches that include protein folding and structure prediction were used. The RIC-8 structural model is composed of 10 armadillo folding motifs, organized in a right-twisted alpha-alpha super helix. In order to validate the structural model, a His-tag fusion construct of RIC-8 was expressed in *E. coli*, purified by affinity and anion exchange chromatography and subjected to circular dichroism analysis (CD) and thermostability studies. This model together with the comparison among RIC-8 proteins that shows a high conservation in the carboxy region, deletion mutants that remove the last three armadillo domain were created in order to search a loss of the GEF function. The mutants could not be expressed in bacteria for *in vitro* assays, but their expression in HEK293T culture showed that all of them preserved the GEF activity. Furthermore, confocal microscopy showed that all the mutants could translocate to plasmatic membrane under stimulation with isoproterenol, and have the capacity to interact with G α s. The results of this thesis has allowed present the first 3D model for a RIC-8 protein, as well as classify RIC-8 as a new member of the protein family with

armadillo repeats. Functionally, the carboxi terminal region, the most conserved among RIC-8, did not show has the GEF activity, and did not alter its behavior in HEK293T cell cultures while was stimulated with isoproterenol.

I. INTRODUCCIÓN

1.- Mecanismo de activación y desactivación de proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas ($G\alpha\beta\gamma$) participan en la regulación de vías de transducción de señales entre receptores de transmembrana y sistemas efectores intracelulares en todos los tejidos (Gilman AG, 1987). Estas proteínas se acoplan a una familia de receptores de transmembrana denominados GPCR (del inglés “**G-Protein Coupled Receptor**”), los cuales al ser activados por sus respectivos ligandos actúan sobre el heterotrímico, induciendo el intercambio del nucleótido GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$, permitiendo la disociación del heterotrímico en las especies activas $G\alpha$ -GTP y el heterodímero $G\beta\gamma$ (Gilman AG, 1987; Offermanns S, 2003). Los GPCR han sido también denominados proteínas GEF (del inglés “**Guanine-nucleotide Exchange Factor**”), por su capacidad de inducir el intercambio de GDP por GTP. Tanto la subunidad $G\alpha$ -GTP como el heterodímero $G\beta\gamma$ pueden regular la actividad de proteínas blanco (Offermanns S, 2003). Posteriormente la subunidad $G\alpha$ -GTP hidroliza el GTP por su actividad intrínseca GTPasa, generándose la especie inactiva $G\alpha$ -GDP la cual se reasocia con el heterodímero $G\beta\gamma$ (**Figura 1**). En los últimos años se han identificado otras familias de proteínas con actividad GEF, aparte de los GPCR. Aunque todas presentan actividad GEF como denominador común, ellas difieren en su estructura terciaria. Esto indica que todas estas proteínas GEF se han generado mediante un mecanismo de evolución por convergencia. En otras palabras, ellas provienen de ancestros genéticos distintos, pero han convergido hacia una misma función (Sprang, 2001; Erickson y Cerione, 2004; Rossman y col, 2005). Desde el punto de vista estructural este aspecto resulta interesante, pues casi no existe relación alguna en la estructura terciaria entre las diferentes proteínas GEFs para distintas proteínas G (**Figura 2**), ya sea

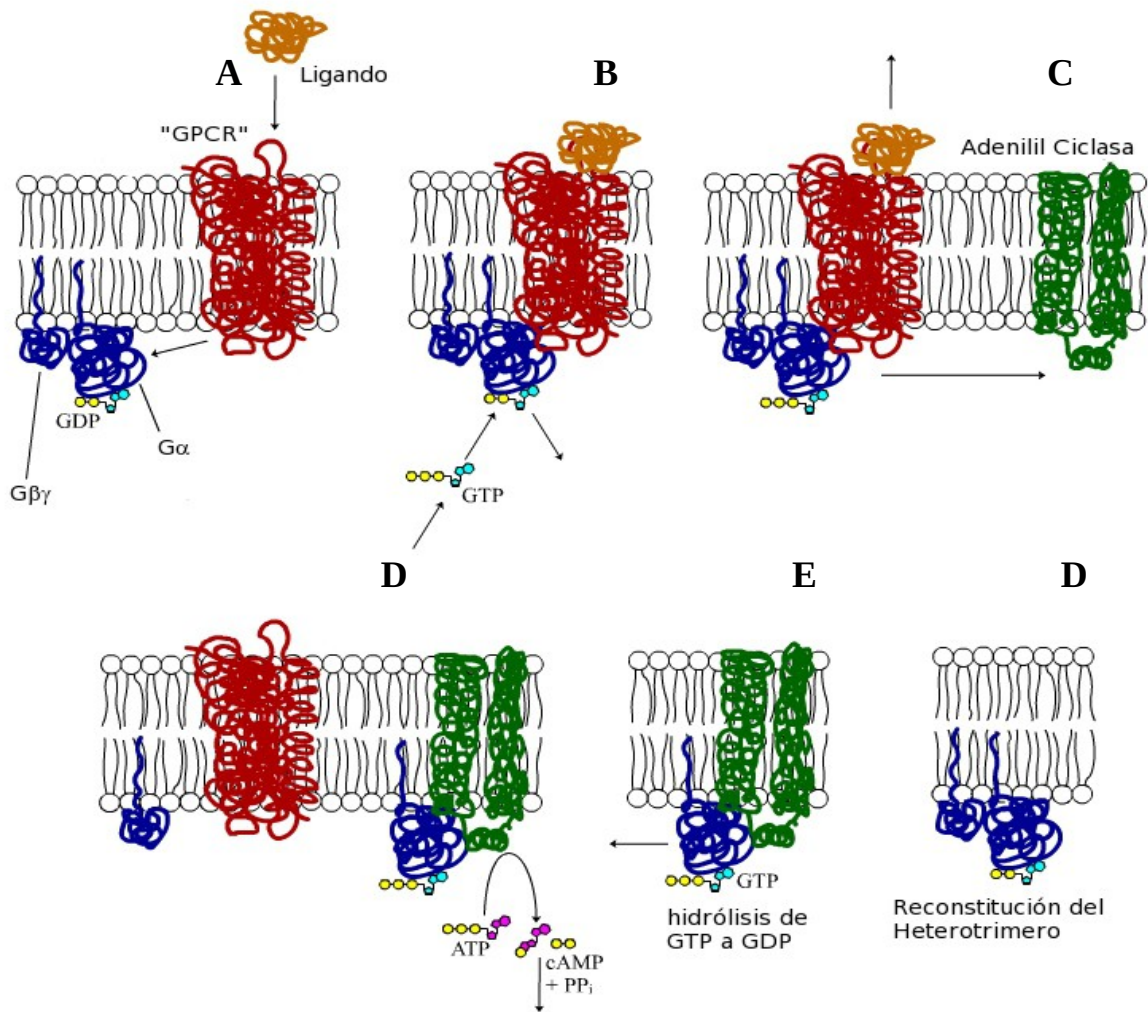


Figura 1. Ciclo de activación y desactivación de proteínas G heterotrimericas. El ligando al interactuar con el receptor GPCR (A) induce simultáneamente el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$ y la disociación del heterotrímtero en las especies activas $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$ (B y C). La subunidad $G\alpha$ -GTP activa el sistema efector, en este caso la enzima Adinilil Ciclasa para la síntesis del segundo mensajero AMPc (D). Finalmente la subunidad $G\alpha$ -GTP a través de su actividad GTPásica intrínseca hidroliza el GTP, generando la especie inactiva $G\alpha$ -GDP que se re asocia al heterodímtero $G\beta\gamma$, cerrando el ciclo (E y F).

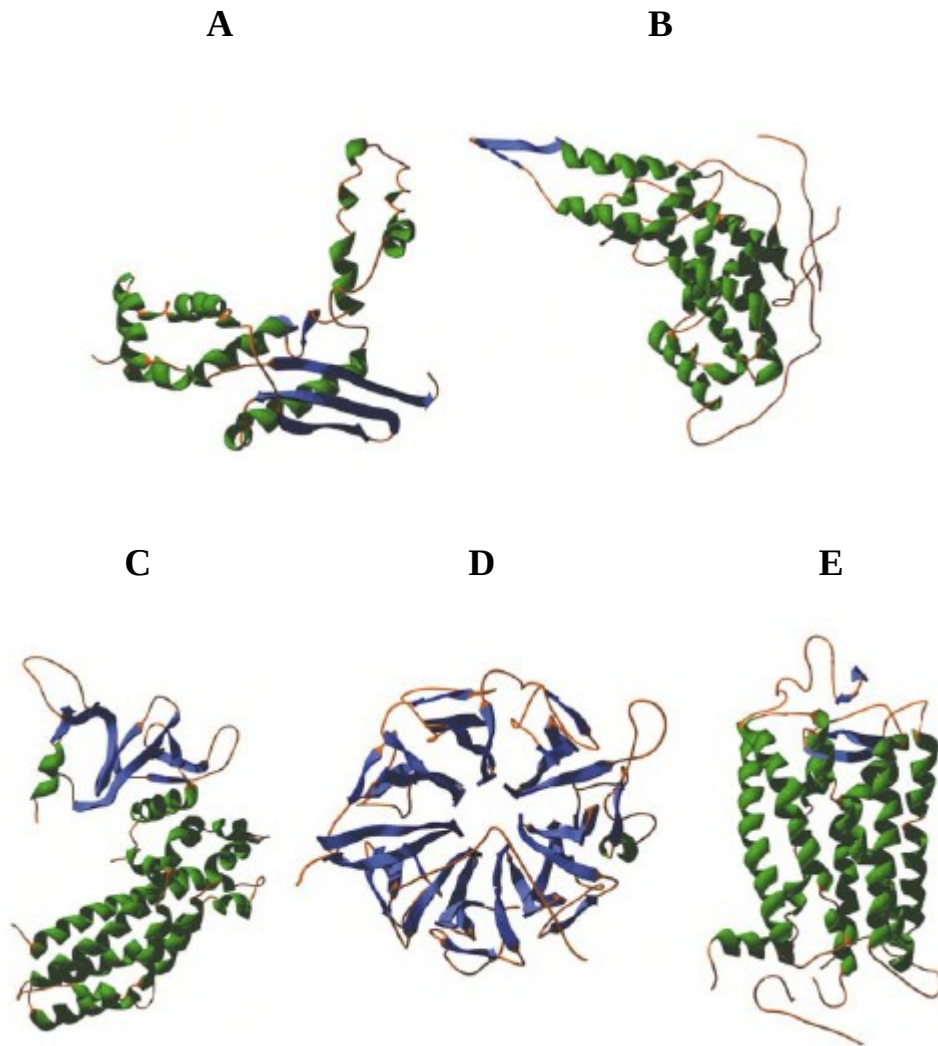


Figura 2. Distintos tipos de plegamiento presentes en diferentes proteínas con actividad GEF.

A) Factor de elongación Ts de *Thermus thermophilus* (1IAP); **B)** Dominio Ras-cdc25 de SOS1 humana (1BKD); **C)** Dominio DH-PH de SOS1 humano (1DBH); **D)** Ran-GEF humano RCC1 (1A12); **E)** Rodopsina de bovino (1F88). Tomado desde Sprang, 2001. Los códigos PDB son presentados entre paréntesis

proteínas G pequeñas o grandes (Cherfils y Chardin, 1999; Sprang, 2004).

El mecanismo por el cual distintos GEF inducen el intercambio de GDP por GTP en las proteínas blanco también sería diferente (Cherfils y Chardin, 1999; Karnoub y col, 2001; Zhang y col, 2005), pero con algunos elementos conservados. Al respecto, es importante destacar la presencia de dos aminoácidos, uno es generalmente leucina y el otro de carácter ácido en la zona de interacción con la proteína G y ambos muy significativos para la función GEF. Las actividades GEF se asocian a un dominio bien estructurado y conservado dentro de los miembros de una familia (Cherfils 2001; Sprang, 2001; Mossessova y col, 2003; Williams y col, 2004; Mori y col, 2005), la excepción son los GEF de transmembrana o GPCR, donde se ha caracterizado el mecanismo GEF de sobre $G\alpha_i$ (Johnston y Siderovski, 2007); no obstante, este mecanismo no ha sido extrapolado a el resto de los GPCR, por lo cual en estos últimos aún se desconoce el dominio con la actividad GEF (Sprang, 2001; Geiser y col, 2006). Todo lo anterior hace suponer que los dominios GEF difieren entre las distintas familias.

2.- RIC-8 como proteína GEF para proteínas G heterotriméricas

Recientemente se ha identificado una nueva familia de proteínas citosólicas con actividad GEF para proteínas G heterotriméricas que no pertenecen a los GPCR y con acción ligando independiente ya que no son receptores (Miller y col, 2000). Esta familia de proteínas ha sido llamada RIC-8 (del inglés “**R**esistance to **I**nhibitors of **C**holinesterase”) (Miller y col, 2000). Se ha visto que las proteínas RIC-8 permiten una acción más prolongada de las proteínas G, debido a que potencian el efecto generado inicialmente por el GPCR. Debido a que RIC-8 es GEF solo para la forma $G\alpha$ -GDP libre y no para el heterotrímero (Tall y col, 2003), estas mantienen el ciclo activado por más tiempo, evitando que la subunidad $G\alpha$ -GDP se reasocie al heterodímero $G\beta\gamma$ (Figura 3).

Se ha observado en *C. elegans* y *D. melanogaster* que la proteína RIC-8 es importante para la señalización mediada por $G\alpha_q$ y $G\alpha_s$ en la sinapsis neuronal y durante la embriogénesis. Debido a ello ha recibido también el nombre común de sinembrina (de la conjunción de las palabras en inglés “**Syn**apsis” y “**embryogenesis**”) (Miller y col, 2000; Miller y Rand, 2000; Couwenbergs y col, 2004, Schade y col, 2005). Su tamaño promedio es de 63 KDa y en organismos superiores se han detectado dos isoformas: RIC-8A y RIC-8B (Tall y col., 2003). Se ha observado que estas dos isoformas se comportan como proteínas GEF para distintas subunidades $G\alpha$ (Tall y col, 2003; Romo y col, 2008)), a través de una interacción específica con cada subunidad $G\alpha$ (Tall y col, 2003; Tall y Gilman, 2004; Klattenhoff y col, 2003). Es importante destacar nuevamente que la interacción ocurre con la especie $G\alpha$ -GDP disociada y no con el heterotrímero, pues RIC-8 al reconocer la especie $G\alpha$ -GDP (generada en la etapa de desactivación por la actividad GTPásica intrínseca de la subunidad $G\alpha$) induce en ella nuevamente el intercambio GDP/GTP de manera independiente del receptor, prolongando en el tiempo la especie activa $G\alpha$ -GTP (Tall y col, 2003). La especie $G\beta\gamma$ también queda libre al estar impedida su re-asociación con $G\alpha$ -GDP (**Figura 3**). Se ha propuesto un modelo de acción para RIC-8A *in vivo*, en el cual la especie $G\alpha$ -GDP libre es reconocida previamente por proteínas con dominio GoLoco y con actividad GDI (del inglés “**G**uanine-nucleotide **D**isociation **I**nhibitor”). El complejo estable $G\alpha$ -GDP/GoLoco sería el blanco biológico para la proteína RIC-8A, desplazando a GoLoco del complejo y activando nuevamente a $G\alpha$ -GDP por inducción del intercambio de GDP por GTP (Afshar y col, 2004; Tall y Gilman, 2005). Sin embargo, este modelo no ha sido demostrado para la isoforma RIC-8B.

La mayoría de los estudios hasta la fecha se han realizado con la caracterización funcional de RIC-8A, pues posee una alta similitud con RIC-8 de *C. elegans* (Tall y col, 2003; Wang y col,

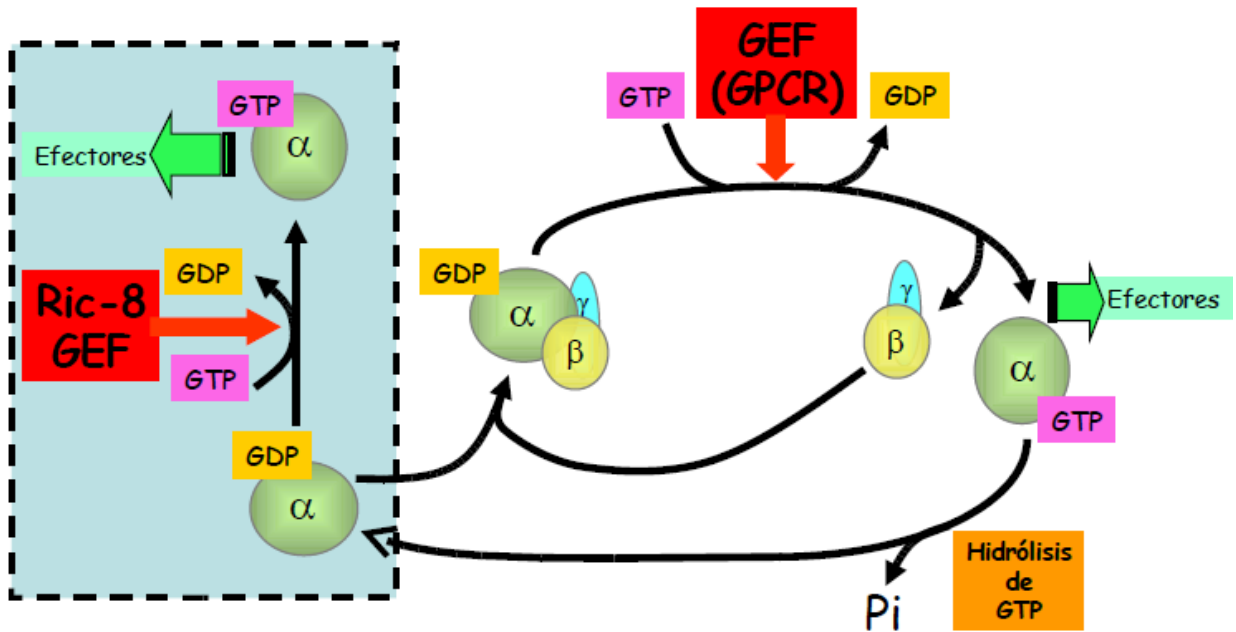


Figura 3. Mecanismo de acción GEF para RIC-8. La forma $G\alpha$ -GDP libre generada inicialmente por el GPCR es reconocida por RIC-8 lo cual induce el intercambio de GDP por GTP (actividad GEF) y activa nuevamente a la subunidad $G\alpha$ prolongando su acción sobre los sistemas efectores. El heterodímero $G\beta\gamma$ también queda libre por un tiempo más prolongado, siendo capaz de regular en paralelo otros efectores.

2005) que es el organismo donde más se ha estudiado su función fisiológica. A pesar de la alta identidad de secuencia entre RIC-8A y RIC-8B, aún existe desconocimiento acerca de RIC-8B. Para la isoforma RIC-8A se ha logrado estandarizar una metodología de expresión y purificación en bacterias que permitió la caracterización de su función GEF *in vitro* (Tall y Gilman, 2004).

A través de ensayos de co-inmuno precipitación se ha mostrado cómo las proteínas RIC-8 de *C. elegans* y RIC-8A humana interaccionan con un set único de proteínas G α (Tall y col, 2003). Estos resultados se han corroborado con estudios de interacción por medio de la técnica de “doble híbrido” en levaduras, en los cuales se usó como “bait” a RIC-8A o RIC-8B y como “prey” las distintas subunidades G α (Tall y col, 2003). Estos estudios han demostrado además que la interacción entre RIC-8 y las subunidades G α se traducen en actividad GEF de RIC-8 sobre las subunidades G α , como lo demuestran los trabajos para RIC-8A (Tall y col., 2003; Tall y Gilman, 2004), y los que involucran la medición de la actividad GEF de manera indirecta para la isoforma RIC-8B, a través de la medición de AMPc intracelular (Von Dannecker y col, 2005).

3.- Características funcionales y estructurales de RIC-8

El conocimiento de la función de RIC-8 proviene de los trabajos realizados en *C. elegans*, donde se ha observado la importancia de esta proteína para la sinapsis y para el desarrollo embrionario. Se sabe que RIC-8 participa en la regulación de la división asimétrica de las células durante el desarrollo embrionario temprano, dirigiendo la polarización del uso mitótico hacia un lado de la célula en el proceso de división. Una función similar se ha encontrado para RIC-8 en *D. melanogaster* (Miller y Rand, 2000; Afshar y col, 2004 y 2005; Couwenbergs y col, 2004; Hess y col, 2004; Wang y col, 2005). La depleción de RIC-8 por siRNA genera letalidad en embriones de *C. elegans*, y lo mismo ocurre cuando se expresan mutantes de esta proteína (Miller

y col, 2000; Couwenbergs y col, 2004). En mamíferos se ha visto que el “knock out” para RIC-8 es letal, mientras que los organismos heterocigotos o mutantes para la proteína presentan problemas de memoria espacial así como de ansiedad (Tonissoo y col, 2006). Como se mencionó anteriormente, un aspecto interesante entre ambas isoformas RIC-8A y RIC-8B es que a pesar de la alta similitud e identidad de secuencia que presentan, reconocen y actúan de manera muy específica como GEF diferentes proteínas $G\alpha$ (Tall y col, 2003). Tampoco se conoce la región y/o dominio de estas proteínas donde está localizada la función GEF. Los únicos datos estructurales que existen son: a) el alto grado de conservación de estructura primaria entre las diferentes RIC-8 (Miller y col, 2000; Tall y col, 2003; Wang y col, 2005); y b) la generación en *C.elegans* de proteínas sin función por mutaciones (Miller y col, 2000; Couwenbergs y col, 2004). Complementando estos datos, se ha demostrado que la porción amino terminal (posición aa 1-300) de RIC-8A es la que interacciona con las proteínas G (Nishimura y col., 2006). Esta observación es interesante, pues la mayor conservación de secuencia entre las RIC-8 es hacia el extremo carboxilo terminal, como lo muestra un análisis realizado con el servidor PRINTS (<http://umber.sbs.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/PRINTS.html>; Attwood y col, 2003), el cual es capaz de identificar seis motivos en esta proteína que corresponden a secuencias cortas altamente conservadas.

En el contexto biológico, en el proceso de maduración de los ovocitos de *X. Laevis* RIC-8 (xRIC-8) posee un rol importante. A través de su actividad GEF para $G\alpha_s$, regula positivamente a la enzima adenilil ciclasa, aumentando el nivel intracelular de AMPc, el cual mantiene a los ovocitos detenidos en la fase G2 de la meiosis I (Bagowski y col, 2001; Bayaa y col, 2000). Ensayos de depleción y sobre expresión de xRIC-8 en el ovocito de *X. laevis* (Romo y col, 2008) confirman el hecho que xRIC-8 es la proteína encargada de mantener los niveles elevados de AMPc al interior del ovocito por la activación constante a la proteína $G\alpha_s$.

La ausencia de una metodología estandarizada para la purificación de la isoforma RIC-8B, no ha permitido la utilización de nuevas técnicas para medir interacción entre proteínas, como “Surface Plasmon Resonance” (SPR). Sin embargo se ha logrado para la interacción entre RIC-8 de *C. elegans* y GOA-1 ($G\alpha_o$) y GPA-16 ($G\alpha_i$). Pese a lo anterior, en este trabajo no se determinan los valores de constantes de disociación entre ambas proteínas (Afshar y col, 2005). La posibilidad de expresar grandes cantidades de RIC-8 con un nivel de pureza elevado, permitirá realizar estudios estructurales, como explorar la utilización de técnicas para determinar la estructura tridimensional de esta proteína. Obtener información estructural precisa, posibilitará realizar estudios funcionales adicionales a través de la mutación de amino ácidos específicos. Es necesario por lo tanto establecer un protocolo cuidadoso de expresión y purificación de la proteína completa y regiones importantes en función de acuerdo a la información estructural previa disponible.

Se conoce para las proteínas GEF de proteínas G pequeñas su dominio catalítico el cual está bien estructurado y basado en este conocimiento se espera que RIC-8 lo posea también. En ningún estudio hasta la fecha se ha abordado la problemática de disecar el dominio GEF para RIC-8. El único estudio que apunta en este sentido es el de Nishimura y colaboradores (Nishimura y col, 2006) donde se demuestra que la interacción de RIC-8 de *C. elegans* con las subunidades $G\alpha$ es a través de la porción amino terminal. Sin embargo, Nishimura no evalúa la función de esta mutante de delección. Además, este mismo autor observa que la mutación A275E también disminuye la interacción entre RIC-8 y la proteína G. Por lo anterior, sigue siendo una pregunta abierta la identificación del dominio GEF de RIC-8.

4.- Herramientas bioinformáticas para el estudio estructural de RIC-8

En la actualidad se cuenta con una serie de herramientas de análisis y predicción *in silico*

basadas en datos experimentales. Diferentes secuencias y estructuras que son depositados en las bases de datos pueden ser utilizadas como fuente de información para resolver problemas de la relación estructura-función. Adicionalmente a la búsquedas globales usando BLAST, se pueden realizar otros tipos de análisis que esencialmente apuntan a localizar zonas o motivos putativos para la función en estudio. Los antecedentes disponibles señalan que la actividad GEF se genera por la interacción entre la proteína GEF y la proteína G. Esta interacción ha sido caracterizada en los complejos proteína G pequeña está dirigida hacia la superficie de la proteína G donde se encuentra el bolsillo de unión del nucleótido GDP y GTP. Esta información, que es común para todos los GEF de proteínas G pequeñas, permite enfocar la búsqueda en RIC-8 de una región que tenga alta probabilidad de presentar estas características, debido a la similitud estructural entre proteínas G pequeñas y proteínas G α . El uso de algoritmos bioinformáticos de análisis de secuencias, como los que utiliza el servidor SMART (Schultz y col, 1998; Letunic y col, 2006) son adecuados para comparar secuencias de proteínas ya caracterizadas estructuralmente. El principio de este servidor consiste en alinear todas las secuencias de aminoácidos de cada dominio conocido, y buscar el ancestro más primitivo para cada dominio. De este modo, cualquier proteína que presente motivos consistentes con este ancestro es probable que posea un plegamiento similar, con lo cual se puede inferir y definir un posible dominio GEF para la proteína en estudio. Como lo anterior implica la presencia de un ancestro común para todas las proteínas, esta situación no siempre se puede dar. Un segundo principio de análisis bioinformático es aquel que señala que la estructura es más conservada que la secuencia. El corolario de este principio es que aunque no exista similitud de secuencia suficiente entre proteínas que indique una conexión directa evolutiva, es posible que ellas posean la misma estructura.

De acuerdo con lo anterior, existe una redundancia de estructuras proteicas. Esto ha posibilitado el desarrollo de softwares que permiten predecir la estructura de una proteína a partir

de su secuencia aminoacídica. La metodología más usada es el “modelaje comparativo”, en el cual dada una secuencia problema que posea al menos un 30% de identidad con la secuencia de una proteína de estructura conocida, se asume que ambas poseerán la misma estructura (Eswar y col, 2006). No obstante, muchas veces se enfrenta el problema en el cual no se logra identificar una proteína “templado”, término con el cual se nombra a la proteína de estructura conocida. Frente a esto, es posible usar otra técnica bioinformática denominada “reconocimiento de plegamiento” o “threading”. Como su nombre en inglés lo indica, esta técnica se basa en “tejer” o “hebrar” la cadena polipeptídica en todos los plegamientos conocidos para proteínas. En cada uno de estos estados la proteína es evaluada energéticamente y aquella conformación que le confiera la menor energía y/o mayor estabilidad, se asume como la estructura de la proteína problema. Hoy en día, ambas técnicas señaladas anteriormente son ampliamente usadas y se sustentan en el gran número de estructuras depositadas en el “Protein Data Bank” (<http://www.pdb.org>). Esto permite de manera relativamente rápida, conocer la estructura terciaria o el plegamiento de una proteína con solo conocer su estructura primaria.

5.- Contexto general del presente trabajo de tesis

En este trabajo de tesis doctoral se abordó el estudio de la relación entre estructura y función de la proteína RIC-8, con el objetivo de visualizar una estructura que dé cuenta de las diversas funciones que presenta esta proteína, principalmente su capacidad de interactuar con varias proteínas y de poseer actividad GEF. El modelo de estudio utilizado fue la proteína RIC-8 de *Xenopus laevis* (AAZ23806), la cual fue clonada previamente en nuestro laboratorio y ha sido estudiada funcionalmente en el contexto de la regulación del proceso de maduración de ovocitos de *X. laevis* (Romo y col, 2008). También nuestro grupo de trabajo ha demostrado que posee la capacidad de interactuar con otras proteínas como δ -Cop, Borealina e INCENP (Lara, 2008).

Las aproximaciones experimentales utilizadas que permitieron caracterizar la relación estructura-función de xRIC-8 se pueden clasificar en técnicas *in silico*, como también *in vitro* e *in vivo*. Las técnicas *in silico*, o estudios bioinformáticos aplicados al análisis de estructura primaria, mostraron una alta conservación de secuencia de xRIC-8 hacia la porción carboxilo, con respecto a las demás proteínas RIC-8. Dichos estudios además revelaron que todas las proteínas RIC-8 forman una familia única, sin similitud de secuencia con otras, según lo obtenido por estudios comparativos de BLAST. Lamentablemente lo anterior imposibilitó estudios de reconocimiento de dominios con actividad GEF por análisis convencionales de secuencia aminoácidica. Fue necesario utilizar técnicas más complejas, como el “reconocimiento de plegamiento”, la cual permitió predecir un plegamiento de tipo alfa-alfa superhélice para xRIC-8, específicamente de la familia de repeticiones armadillo. Con esta información se generó el primer modelo 3D para una proteína RIC-8, con un elevado en contenido α helicoidal, presentes en 10 dominios o repeticiones armadillo.

Con respecto a las técnicas *in vitro* e *in vivo*, la solubilidad presentada por xRIC-8 al ser expresada en *E. coli*, permitió estandarizar un protocolo de purificación con lo cual pudimos realizar estudios biofísicos como dicroísmo circular y estudios de termo estabilidad, para corroborar nuestro modelo. Basado en estos resultados, diseñamos mutantes de delección para xRIC-8 con el objetivo de identificar la región con actividad GEF. Estas mutantes fueron expresadas en células HEK293T y se analizó su actividad GEF de manera indirecta, a través de mediciones de niveles de AMPc intracelular, ya sea de manera directa o en respuesta de un gen reportero. Estos estudios revelaron que la región carboxilo, y más conservada de RIC-8, no alberga la función GEF.

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

“La actividad GEF de xRIC-8 está definida por un dominio de la proteína, el cual funciona de manera independiente del resto de la proteína”

III. OBJETIVOS

1.- Objetivo General: Caracterizar la estructura y función de la proteína xRIC-8

2.- Objetivos Específicos:

- 1.- Predecir por técnicas bioinformáticas la estructura de la proteína xRIC-8
- 2.- Expresar y purificar xRIC-8 y diferentes regiones de la proteína
- 3.- Caracterizar la actividad GEF de xRIC-8 y de diferentes regiones de la proteína

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1 MATERIALES

1.- Reactivos y soluciones generales

- Acetato de sodio (3 M, pH 5,2)
- Agarosa (1% en TAE 0,5x)
- Agua nano pure (agua destilada y desionizada)
- APS (Persulfato de amonio al 12,5%)
- Azul de Coomasie (0,25 gramos Coomassie brilliant Blue R-250 en 90 mL metanol: H₂O (1:1, v/v) y 10 mL ácido acético glacial)
- Bromuro de etidio (10 µg/mL)
- *Buffer* de corrida proteínas (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 0,1%(p/v) SDS)
- *Buffer* de carga proteínas 1X (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 10% glicerol, 20 mM DTT)
- *Buffer* de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol)
- *Buffer* separador 2X (750 mM Tris-base, 0,2% (p/v) SDS pH 8,8)
- *Buffer* concentrador 2X (250 mM Tris-base, 0,2% (p/v) SDS, pH 6,8)
- Etanol (100%)
- Etanol (70%)
- Fenol/cloroformo (Fenol, Cloroformo y Alcohol isoamílico, en proporción 25:24:1 v/v)
- IPTG (100 mM)
- Isopropanol (100%)
- LiCl (5 M)
- NaCl/Polietilenglicol (1,6 M NaCl, 13% p/v PEG 8.000)

- PEG/TE/LiAc (LiAc 0,1 M, TE 1X, PEG 3.350 40% p/v (Sigma))
- PBS 1X (NaCl 150 mM, 20 mM NaHPO₄, pH 7,4)
- Reactivo ECL para detección de quimioluminiscencia (Pierce)
- Rojo ponceau (0,1% p/v rojo ponceau, 5% v/v ácido acético)
- Solución de acrilamida 30% (29% (p/v) acrilamida, 1% (p/v) bisacrilamida)
- Solución de desteñido (10% Acido Acético)
- Solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM pH 8,0)
- Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1%)
- Solución III (CH₃COONa 3M, CH₃COOH 0,2M)
- TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA, pH 8,5)
- TBS-Tween 20 (150 mM NaCl, 10 mM Tris, 0,05% Tween 20)
- TE 1X (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0)
- TE/LiAc (TE 1X, LiAc 0,1 M)

2.- Herramientas bioinformáticas

Para los estudios bioinformáticos se usó la secuencia de xRIC-8 reportada bajo el código GenBank AAZ23806, así como las distintas herramientas listadas a continuación.

2.1 Análisis de estructura primaria

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul y col, 1990):
<http://www.expasy.org/tools/blast/>
- SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; Letunic y col, 2006):
<http://smart.embl-heidelberg.de/>

- InterProScan (Quevillon y col, 2005):

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>

2.2 Predicción de estructura secundaria

- PSIPRED (Protein Structure Prediction Server; McGuffin y col, 2000):

<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>

2.3 Reconocimiento de plegamiento

- HHPRED (Söding y col, 2005): <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>
- I-TASSER (Zhang, 2008): <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER>
- 3D-JURY (Ginalski y col, 2003): http://www.meta.bioinfo.pl/submit_wizard.pl
- PSIPRED (McGuffin y col, 2000): <http://www.bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>
- SP4 (Liu y col, 2007): <http://www.sparks.informatics.iupui.edu/SP4>

2.4 Construcción de modelo 3D para xRIC-8

- I-TASSER (Zhang, 2008): <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER>
- Modeller (Eswar y col, 2006): <http://www.salilab.org/modeller/>
- SCWRL (Canutescu y col, 2003): <http://www1.jcsg.org/scripts/prod/scwrl/serve.cgi>
- GROMACS (Hess y col, 2008): <http://www.gromacs.org>
- ProSAII (Protein Structure Analysis; Wiederstein y Sippl, 2007)
<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>
- RAMPAGE (Ramachandran Page; Lovell y col, 2003):
<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>

- PDB2PQR Server (Dolinsky y col, 2007): <http://pdb2pqr-1.wustl.edu/pdb2pqr/>
- APBS (Baker y col, 2001): <http://www.poissonboltzmann.org/apbs/>
- PyMol (DeLano, 2002): <http://pymol.org/>

3.- Vectores de expresión

- Vectores de expresión procarionte: pQE80L y pQE81L (Qiagen)
- Vector de expresión eucarionte: pCS2+6myc
- Vector de subclonamiento: Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen)

4.- Enzimas

- Enzimas de restricción: XhoI, KpnI, BamHI y HindIII. Todas de New England Biolab
- ADN polimerasas: Kapa HiFi y Kapa Taq
- Fosfatasa alcalina SAP (New England Biolab)

5.- Anticuerpos

- IgG monoclonal de ratón contra epítotope Myc (Santa Cruz). Dilución 1:5.000
- IgG monoclonal de ratón contra epítotope 6His (Clontech). Dilución 1:14.000
- IgG policlonal de conejo contra G α s (Millipore). Dilución 1:5.000
- IgG policlonal de cabra contra IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch). Dilución 1:10.000
- IgG policlonal de cabra contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Jackson Immunoresearch). Dilución 1:5.000
- IgG policlonal de cabra contra IgG de conejo conjugado a fluoróforo cianina emisión

verde (Jackson). Dilución 1:250 para inmunocitoquímica

6.- Oligonucléotidos

N°	Oligo (5' → 3')	Nombre	Tm (°C)
1	cgg ggt acc cta acc atc aga ggt cac ccc	ΔH anti sentido	58
2	cgg ggt acc cta ccc ctc tcc acg gcc acc	Δ10 anti sentido	56
3	cgg ggt acc cta cac gtg agt cat cag acg	Δ10-9 anti sentido	56
4	cgg ggt acc cta ctc ttc tac acg tcc tgt gac	Δ10 anti sentido	60
5	cgg ggt acc cta att ctc ctt gca gag gac gaa	Δ10-9 anti sentido	62
6	cgg ggt acc cta atg gac acg aga act ttc agt	Δ10-9-8 anti sentido	60
7	agg atc ctc cat gcc agc cat gg	pQE80l xRIC-8 sentido	64.8
8	ccc gct cga gat gcc agc cat gga cct g	pCS2+6Myc xRIC-8 sentido	49.4

En color amarillo se resalta el sitio de restricción para la enzima KpnI, en rojo para BamHI y en verde para XhoI.

7.- Cepas bacterianas

- Para expresión de proteínas: *E. coli* BL21(DE3)
- Para obtención de plásmidos: *E. coli* DH5α

8.- Línea celular

- HEK293T

9.- Medios de cultivo

- LB (Luria – Broth): 1% p/v triptona, 0,5% p/v extracto de levadura, 1% p/v NaCl. Todo en agua destilada

- LB agar: 1% p/v triptona, 0,5% p/v extracto de levadura, 1% p/v NaCl, 1% p/v agar. Todo en agua destilada
- DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Media”) (Gibco) suplementado con 10% de Suero Fetal de Bovino (FBS)

10.- Purificación de proteínas

- Resina Ni-NTA (Qiagen)
- Solución 100 mM NiCl₂ de alta pureza
- FPLC Merk Hitachi Bomba L-6210 Intelligent Pump, detector L-4250 UV/Vis e integrador D25.000
- Columna HiLoad Q sepharose (General Electric)
- Colector de fracciones SuperFraction Colector SF-2120 (Advantec)
- *Buffer A*: 50 mM fosfato pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol, 20 mM imidazol, coctel de inhibidores “Complete” (Roche)
- *Buffer B*: 50 mM fosfato pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol, 100 mM imidazol, coctel de inhibidores “Complete” (Roche)
- *Buffer C*: 50 mM fosfato pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoetanol y 0,1 mM PMSF
- *Buffer D*: 50 mM fosfato pH 8,0, 500 mM NaCl, 0.1 mM PMSF, 10 mM Imidazol, 10% glicerol y 5 mM β-mercaptoetanol
- *Buffer E*: 50 mM fosfato pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 mM PMSF, 100 mM Imidazol, 10% glicerol y 5 mM β-mercaptoetanol
- *Buffer F*: 20 mM HEPES pH 8,0, 250 mM NaCl, 1 mM PMSF y 5 mM β-mercaptoetanol

- *Buffer G*: 20 mM HEPES pH 8,0, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF y 5 mM β -mercaptoetanol

11.- Dicroísmo circular

- Espectropolarímetro J-715 (Jasco)
- *Buffer* de muestra: 50 mM fosfato pH 8,0, 200 mM NaCl
- Cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico y 300 μ L de volumen de muestra
- Servidor SOMCD (Unneberg y col, 2001): <http://geneura.ugr.es/cgi-bin/somcd/index.cgi>

12.- Fluorescencia

- Espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu)
- Espectrofluorímetro Novostar (BMG Labtech, Inc)
- *Buffer A*: 50 mM HEPES pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM GTP-g-S y 0.5 mM GDP
- *Buffer B*: 50 mM HEPES pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 2 μ M GDP y 4 μ M GTP- γ -S-BODIPY® (Invitrogen)
- Cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y 2 mL de volumen de muestra
- Placas de 96 pocillos para fluorescencia

13.- Medición de AMPc intracelular

- Kit “Dual-Luciferase Reporter Assay System” (Promega)
- Kit “cAMP HTS Immuassay” (Millipore)
- Luminómetro Victor3 (PerkinElmer)

14.- Microscopía confocal

- Porta objetos y cubre objetos
- Líquido de montaje DAKO
- Tinción nuclear TOPRO, dilución 1/1.000
- Solución paraformaldehído (PFA) 4% en PBS
- Solución PBS con 1% BSA
- Solución PBS con 0,1% Tritón X-100
- Microscopio confocal Eclipse TE 2000-U (Nikon)

IV.2 MÉTODOS

1.- Técnicas de uso general

1.1.- Preparación de bacterias químicamente competentes

La expresión de proteínas recombinantes para su posterior purificación se realizó en bacterias *E. coli* BL21(DE3). Para ello, se prepararon bacterias competentes para su transformación con el ADN plasmidial que contiene el gen que codifica para la proteína recombinante xRIC-8. 50 mL de medio LB fueron inoculados con 500 μ L de un cultivo bacteriano, crecido toda la noche a 37 °C, e incubados a esta misma temperatura en agitación hasta una OD₆₀₀ entre 0,6 y 0,8. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 3.000 rpm en rotor SS-34 por 5 min a 4 °C, y el precipitado fue suspendido en 25 mL de una solución 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 y mantenido a 4 °C por 1 hora. Terminado el tiempo de incubación, las bacterias fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 3.000 rpm en rotor SS-34 por 5 min a 4 °C y suspendidas en la misma solución CaCl₂/Tris-HCl. Alicuotas de 100 μ L fueron guardadas en tubos Eppendorff estériles, congeladas en nitrógeno líquido y guardadas a -80 °C para su

posterior uso.

1.2.- Preparación de bacterias electro competentes

La obtención de los vectores recombinantes codificando el gen de xRIC-8 y de las mutantes de delección en los vectores pQE80, pCS2+6myc y TOPO fueron obtenidos desde bacterias *E. coli* DH5 α transformadas con la técnica de electroporación. Para ello fue necesario preparar bacterias electro competentes, de acuerdo con el protocolo que consistió en incubar toda la noche una colonia de bacterias en 5 mL de medio LB a 37 °C con agitación. Con este cultivo, se inocularon 500 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C bajo agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,7, luego de lo cual el cultivo fue puesto en hielo por uno 30 min para posteriormente colectar las bacterias por centrifugación a 4.000 rpm en rotor GSA a 4 °C durante 20 min. El precipitado bacteriano fue suspendido cuidadosamente en 50 mL de agua “nano pure”, para luego nuevamente colectar las bacterias por centrifugación a 4.000 rpm en rotor GSA por 15 min a 4 °C. La suspensión del precipitado y obtención de las bacterias en agua “nano pure” se repite tres veces. El precipitado de la última centrifugación fue suspendido en una solución de 10% de glicerol y la suspensión centrifugada en las mismas condiciones. El sedimento fue suspendido en aproximadamente 3 mL de la solución 10% de glicerol y alicuotas de 50 μ L fueron guardadas en tubos Eppendorff, para luego ser congelados con nitrógeno líquido y guardados a -80 °C para su posterior uso.

1.3.- Purificación de plásmidos por la técnica de polietilenglicol (PEG)

Se creció un cultivo de 500 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) o kanamicina (50 μ g/mL) y se inoculó con una colonia bacteriana que contenía el plásmido recombinante entre 12 y 16 horas a 37°C con agitación. El cultivo fue centrifugado a 4.000 rpm (Rotor Sorvall GSA)

por 15 min a 4°C y el precipitado fue suspendido en 5 mL de solución I. Las bacterias se lisaron con 10 mL de solución II mezclando por inversión e incubando por 10 min a temperatura ambiente. Se adicionó 5 mL de solución III, se agitó el tubo varias veces e incubó por 10 min en hielo, y finalmente se centrifugó la suspensión a 12.000 rpm (Rotor Sorval SS-34) por 15 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de cuatro capas de gasa, se mezcló con 0,6 volúmenes de isopropanol para precipitar el ADN y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se recuperó centrifugando a 10.000 rpm (Rotor Sorval SS-34) por 15 min a 4°C, se lavó con 1 mL de etanol 70% y se disolvió en 3 mL de *buffer* TE. Luego se precipitaron los RNAs de alto peso molecular adicionando 3 mL de LiCl 5 M, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se centrifugó a 12.000 rpm (rotor Sorvall SS-34) por 10 min a 4°C. El ADN se recuperó del sobrenadante mediante precipitación con 1 volumen de isopropanol. La suspensión se centrifugó a 9.000 rpm (rotor Sorvall SS-34) por 15 min a 4°C, se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70% y se disolvió 500 µL de *buffer* TE conteniendo 20 µg/mL de RNasa A para la digestión de los RNAs de bajo peso molecular y se incubó por 30 min a 37°C. Luego, el ADN plasmidial se precipitó con 500 µL de PEG 8000 13% p/v NaCl 1,6 M, se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4°C en microcentrífuga, se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 70% y el precipitado fue suspendido en 400 µL de *buffer* TE. Esta solución fue mezclada con 1 volumen de fenol/cloroformo para la extracción de las proteínas, mezclando vigorosamente y posteriormente centrifugando a 10.000 x g por 10 min. De esta mezcla se tomó la fase acuosa evitando tomar el precipitado blanco y se realizaron entre 1 y 2 extracciones fenol/cloroformo adicionales para eliminar totalmente presencia de suspensión en la fase orgánica. Finalmente, el DNA plasmidial fue recuperado por precipitación con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol 100%, se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4 °C, el precipitado se lavó con 1 mL de etanol 70% y finalmente se disolvió en un volumen apropiado de agua desionizada y

estéril. Se cuantificó el ADN por medición de su absorbancia a 260 nm y se verificó la construcción por digestión con las enzimas de restricción apropiadas y posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

1.4.- Purificación de plásmidos mediante el kit MIDI prep

Los vectores recombinantes para xRIC-8 y las mutantes de delección, así como también los plásmidos que codifican para las proteínas luciferasa y renilla (pCreLuc y renilla, Dual Luciferase Reporter Assay System, Promega) utilizados para transfectar cultivos celulares, fueron purificados mediante el kit E.Z.N.A.[™] Plasmid Midi Kit (Omega Bio-Tek. Inc) de acuerdo con el protocolo contenido en el kit para plásmidos de bajo número de copias. Los ADN plasmidiales fueron cuantificados por medición de su absorbancia espectrofotométrica a una longitud de onda de 260 nm y paralelamente fueron cuantificados en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Todos los plásmidos fueron almacenados a -20 °C en H₂O “nano pure”.

1.5.- Purificación de plásmidos por la técnica de Mini Lisado

Para preparar ADN plasmidial en pequeña cantidad se siguió el procedimiento descrito por Sambrook y cols. (1989). Para ello se seleccionaron las colonias transformantes y se crecieron en 3 ml de medio LB/Amp a 37 °C por toda la noche. Se tomaron 1,5 ml de cada cultivo, se traspasaron a tubos de microcentrífuga y las bacterias se colectaron por centrifugación a 12.000 x g por 5 minutos. Se eliminó todo el sobrenadante y luego se incubó 5 minutos a temperatura ambiente con 100 µl de solución I. Posteriormente se agregaron 200 µl de solución II y se incubó 5 minutos en hielo. Luego se agregó 150 µl de solución III y se incubó por 5 minutos en hielo. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 12.000 x g por 5 minutos y el sobrenadante se traspasó a otro tubo de microcentrífuga. Se realizó una extracción con un volumen de fenol:

cloroformo: alcohol isoamílico (24: 24: 1), y el ADN plasmidial contenido en la fase acuosa se precipitó con etanol al 100%. El ADN obtenido se resuspendió en 50 µl de buffer TE contiendo ribonucleasa pancreática 20 µg/ml. Finalmente el plásmido purificado se digirió con la(s) enzima(s) de restricción adecuada(s), y se analizó en un gel de agarosa al 1% la presencia del inserto.

1.6.- Extracción de ADN desde gel de agarosa

Los vectores plasmidiales linearizados con enzimas de restricción, así como también los productos de PCR, fueron purificados desde el gel de agarosa para su posterior ligación, usando el kit E.Z.N.A.[™] Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek, Inc.) usando el protocolo contenido el kit con la excepción de que la elusión final desde la columna fue realizada con 25 µL de agua des-ionizada y estéril. La cuantificación del ADN purificado fue realizada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El ADN fue almacenado a -20 °C hasta su utilización.

1.7.- Transformación bacteriana por el método químico

Bacterias *E. coli* BL21 químicamente competentes fueron transformadas con el plásmido pQE80l conteniendo la porción codificante del gen para xRIC-8 o mutantes de delección de ésta, así como también para la proteína Gαs. Para esto, entre 10 y 50 ng de ADN plasmidial fueron incubados con una alícuota de bacterias durante 40 min a 4 °C, para luego ser sometidas a un shock térmico de 42 °C por 2 min y ponerlas rápidamente en hielo por otros 2 min. Luego de esto, se adicionó 650 µL de medio LB sin antibiótico y fueron incubadas bajo agitación durante 1 hora a 37 °C. Terminada la incubación, las bacterias fueron colectadas por centrifugación (10.000 x g por 5 min), suspendidas en 100 µL de medio LB y sembradas en medio solido LB-agar conteniendo el antibiótico de selección ampicilina a una concentración de 100 µg/mL. Las placas

fueron incubadas entre 12 y 18 horas a 37 °C.

La obtención de colonias aisladas es muy importante para los análisis posteriores, para lo cual las bacterias fueron sembradas a una mayor dilución en medio sólido LB-agar con el antibiótico de selección para así obtener un número menor de colonias.

1.8.- Transformación bacteriana por el método de electroporación

Bacterias *E. coli* DH5 α electro competentes fueron transformada con el plásmido proveniente de la ligación de mutantes de delección de xRIC-8 en el vector pCS2+6myc, o bien con la mezcla de ligación de dichas mutantes en el vector TOPO.

Para ello, una alícuota de 50 μ L de bacterias, previamente descongeladas y mantenidas en hielo, fueron incubadas con 10 ng de ADN plasmidial y luego fueron sometidas a la electroporación aplicando un pulso eléctrico de 2.5 kV a 400 W. Posteriormente, se agregó 650 μ L de medio LB a la cubeta, y la mezcla fue puesta en un tubo Eppendorff de 2 mL para su incubación por 1 hora a 37 °C. Terminada esta incubación, las bacterias fueron colectadas por centrifugación (10.000 x g por 5 min), suspendidas en 100 μ L de medio LB y sembradas en medio sólido LB-agar conteniendo el antibiótico de selección ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL, para el plásmido pCS2+6myc o kanamicina a una concentración de 50 μ g/mL para el plásmido TOPO; estas placas fueron incubadas finalmente entre 12 y 18 horas a 37 °C.

De manera similar a la transformación química, es necesario obtener colonias aisladas para su posterior análisis.

1.9.- Electroforesis SDS-PAGE

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% para la separación de proteínas (SDS-PAGE) y para la inmunodetección de proteínas por la técnica de “western blot”. La confección de los

geles se realizó de acuerdo con la siguiente tabla:

	Gel Separador	Gel Concentrador
<i>Buffer</i> separador 2X	2 mL	-----
<i>Buffer</i> concentrador 2X	-----	0.75 mL
Acilamida 30%	1.33 mL	0.3 mL
H ₂ O	0.67 mL	0.45 mL
TEMED	10 µL	5 µL
APS 12%	20 µL	10 µL

Las muestras se incubaron con *buffer* de carga denaturante 5X y se calentaron a baño maría por 10 min. Luego se sembraron en el gel y la electroforesis se realizó inicialmente a 100 V por 30 min, para luego aumentar el voltaje a 150 V hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. Los geles posteriormente se tiñeron con “Azul de Coomassie” para visualizar las proteínas o se sometieron a análisis de “western blot” para determinar la presencia de la proteína específica de interés.

1.10.- Análisis de “western blot”

Las proteínas presentes en el gel SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa por 1 hora a 250 mA. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa fue teñida con “Rojo Ponceau” 0,1% para comprobar la transferencia proteica. Las membranas se incubaron con *buffer* TBS/tween con 5% de leche descremada por 1 hora en agitación. Posteriormente, se incubó con el 1^{er} anticuerpo, anti epítoto His (Clontech) diluido 1:14.000 en TBS/tween 5% leche descremada o anti epítoto Myc (Santa Cruz) a una dilución 1:5.000, por 1 hora con constante

agitación. Terminada la incubación, se procedió a lavar 5 veces por 5 minutos con TBS/tween, y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP, por 1 hora en agitación constante. Los anticuerpos secundarios fueron anti IgG de ratón (dilución en TBS/tween 5% leche descremada de 1:10.000) o anti IgG de conejo (dilución en TBS/tween 5% leche descremada de 1:5.000). Luego se lavó con TBS/tween 5 veces por 5 min. Terminados los lavados, se procedió a revelar usando el kit “Western lightning” (PerkinElmer) usando un film auto radiográfico (Kodak).

1.11.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos anti sentido 1, 2 y 3, y el oligonucleótido sentido 7 fueron usados para obtener las mutantes de delección y su posterior subclonamiento en el vector pQE80L. Los oligonucleótidos anti sentido 4, 5 y 6, y el oligonucleótido sentido 8, fueron usados para amplificar las mutantes de delección y su posterior subclonamiento en el vector pCS2+6myc.

El protocolo de PCR usado fué el siguiente:

- etapa de denaturación inicial : 95 °C por 2 minutos
- etapa de denaturación : 95 °C por 30 segundos
- etapa de hibridación de partidores : $T_m - 5$ °C por 30 segundos
- etapa de síntesis : 72 °C por 2 minutos
- etapa de extensión final : 72 °C por 4 minutos
- etapa de finalización : 4 °C

Las etapas de “denaturación”, “hibridación de partidores” y “síntesis” se repitió 30 veces.

La enzima Taq polimerasa (Kapa Taq) fue empleada para estandarizar la temperatura adecuada de hibridación de los partidores. Una vez obtenida la temperatura adecuada, se utilizó la

enzima Kapa HiFi, que es una polimerasa de alta fidelidad

Los volúmenes de las reacciones con la enzima Kapa HiFi fueron 50 μ L, y se ocupó 1 U de enzima de reacción, 0,4 μ M de partidores, 5 ng de templado, 400 μ M de dNTPs y 1X *buffer* de reacción Kapa HiFi (conteniendo $MgCl_2$). La generación de un producto de PCR positivo fue visualizado mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

1.12.- Digestión analítica de ADN plasmidial

Para verificar el correcto subclonamiento de un fragmento de ADN en un vector, se comparó el patrón de restricción teórico con el experimental. La digestión se realizó en un volumen final de 20 μ l con 200-500 ng de ADN plasmidial, 1-2 unidades de la enzima de restricción respectiva y 0,1 volumen del *buffer* 10X óptimo para la enzima de restricción. La digestión se realizó por 2 a 3 horas a 37 °C. Posteriormente los productos de digestión se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

1.13.- Digestión preparativa de ADN plasmidial

Para obtener los fragmentos de ADN para su posterior subclonamiento en el vector correspondiente, se digirió el plásmido con las enzimas de restricción adecuadas en un volumen final de 70 μ l que contenía 10 μ g de ADN plasmidial, 25 unidades de la enzima de restricción respectiva, y 0,1 volumen del *buffer* 10X para la enzima de restricción. Para el caso de la digestión con la enzima XhoI además se agregó 0,1 volúmenes de BSA 10X. Las incubaciones se realizaron por 3 horas a 37 °C y se verificaron las digestiones analizando 1 μ l de las mezclas de reacción por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El vector luego de la digestión con enzimas de restricción, fue desfosforilado para evitar su re ligación.

Posteriormente se purificó el fragmento de ADN de interés, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y utilización del kit “E.Z.N.A.-Gel Extracción Kit” (OMEGA BIO-TEK).

1.14.- Desfosforilación de ADN plasmidial previamente digerido

Para el subclonamiento de un fragmento de ADN en un vector, luego de la digestión con las enzimas de restricción correspondientes, éste se desfosforiló en sus extremos 5' para impedir su religación. Luego de digerir el ADN plasmidial con las enzimas de restricción, se adicionaron 2 unidades de la enzima fosfatasa alcalina de cangrejo (SAP, New England Biolab). La reacción se realizó a 37°C por una hora y posteriormente se inactivó la SAP por incubación a 65°C por 15 minutos. Luego, se purificó el ADN de interés mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y utilización del kit “E.Z.N.A.-Gel Extracción” (OMEGA BIO-TEK), siguiendo el protocolo incluido en el kit.

1.15.- Transfección celular

Células HEK293T fueron cultivadas hasta un 40-50% de confluencia en placas de 12 pocillos con medio DMEM 10% FBS y antibiótico correspondiente. Posteriormente el medio de cultivo fue reemplazado por medio libre de suero OPTIMEM (Gibco), conteniendo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y los plásmidos que codifican para xRIC-8, las mutantes de delección, *Gαs* y/o los plásmidos pCreLuc y Renilla. Para las distintas transfecciones realizadas se utilizaron las siguientes cantidades de ADN plasmidial:

	Medición de AMPc indirecto	Medición de AMPc directo	Inmunocitoquímica	Co-inmuno precipitación
xRIC-8	100 ng	100 ng	100 ng	1,4 µg
Δ10	400 ng	400 ng	400 ng	5,6 µg
Δ10-9	800 ng	800 ng	800 ng	8,4 µg
Δ10-9-8	600 ng	600 ng	600 ng	8,4 µg
pCreLuc	10 ng	-	-	-
pRenilla	1 ng	-	-	-
Gαs	-	-	-	4 µg

Para los casos de medición de AMPc intracelular, la cantidad de ADN total a transfectar fue siempre la misma: 900 ng para mediciones de AMPc indirecto y 800 ng para mediciones de AMPc directo, completando esa cantidad con el vector pCS2+6myc vacío. Para los experimentos de co-inmunoprecipitación se usaron placas de cultivo de 6 pocillos.

Las células se incubaron con la mezcla de transfección por 4 horas, luego de las cuales se reemplazó por medio DMEM 10% FBS y se esperó por 24 horas para hacer el estudio correspondiente.

2.- Análisis bioinformático de la proteína xRIC-8

2.1.- BLAST y búsqueda de dominios (SMART e InterProScan)

La búsqueda de proteínas homólogas se realizó usando el software BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”), usando la secuencia de xRIC-8 depositada bajo el código de GenBank AAZ23806 y haciendo la búsqueda contra la base de datos UniProt.

La búsqueda de motivos y/o dominios presente en la secuencia de xRIC-8 fue realizada con los servidores SMART e InterPro Scan, con las opciones por defecto en cada uno de ellos.

2.2.- Alineamiento múltiple de secuencias

Los alineamientos múltiples se realizaron con el software CLUSTALW, usando los parámetros por defecto.

2.3.- Predicción de estructura secundaria

La predicción de estructura secundaria de xRIC-8 se realizó analizando la secuencia de xRIC-8 en el servidor PsiPred, utilizando las opciones por defecto que presenta dicha herramienta.

2.4.- Reconocimiento de plegamiento

El reconocimiento de plegamiento para xRIC-8 fue inferido al analizar su estructura primaria con 5 diferentes servidores web: HHPRED, I-TASSER, 3D-JURY, PSIPRED y SP4. Cada servidor fue usado con sus opciones por defecto.

2.5.- Construcción de modelo 3D para xRIC-8

Dos estrategias fueron usadas para desarrollar un modelo 3D de xRIC-8. La primera de ellas fue con el software MODELLER (Eswar y col, 2006), utilizando como templado β -catenina humana (código PDB 1JDH). Las cadenas laterales de los aminoácidos fueron refinadas con el software SCWRL (Canutescu y col, 2003) y el modelo completo fue optimizado mediante minimización energética con el software GROMACS (Hess y col, 2008).

La segunda estrategia usada fue a través del servidor web I-TASSER (Zhang, 2008) el cual conjuga metodología de “threading” local que fragmenta la proteína en estudio y cada fragmento es sometido a “threading” en la base de datos PDB. Aquellas regiones de la proteína que no presentan un acierto positivo, son tratadas con metodologías *ab-initio*. El conjunto de

zonas estructuradas son ensambladas y diferentes modelos son obtenidos y clasterizados, para luego minimizar energéticamente cada “cluster” y obtener un representante de cada uno.

Para ambas estrategias utilizadas, los modelos finales fueron evaluados mediante gráfico de Ramachandran (Lovell y col, 2001) y el servidor web PROSA II (Wiederstein y Sippl, 2007), así como también se estudiaron las características de los aminoácidos expuestos al solvente e internalizados en el modelo. Se definió como un aminoácido expuesto al solvente aquel que su superficie accesible al solvente fue mayor a un 25%.

2.6.- Cálculo de potencial electrostático de superficie

El archivo de coordenadas PDB para el modelo de xRIC-8 fue modificado con el servidor PDB2PQR para adicionar los valores de cargas puntuales de cada átomo según el campo de fuerza Amber. Este nuevo archivo de coordenadas se utilizó en el software APBS, y se calculó el potencial electrostático de superficie utilizando como constante dieléctrica la del agua. La visualización del potencial se realizó con el software Pymol (DeLano, 2006).

3.- Expresión, purificación y caracterización de xRIC-8 y diferentes regiones de la proteína

3.1.- Expresión y purificación de xRIC-8

La proteína xRIC-8 fue expresada en bacterias *E. coli* BL21 y purificada mediante pasos cromatográficos sucesivos de afinidad (IMAC) e intercambio iónico.

Bacterias *E. coli* BL21 fueron transformadas con el plásmido pQE811-xRIC-8 usando el método de transformación química descrito previamente. Una colonia bacteriana aislada fue cultivada toda la noche en 5 mL de medio LB con antibiótico de selección Ampicilina, y con este cultivo se inoculó 4 litros de medio LB. Este último cultivo se incubó a 25 °C hasta alcanzar una

OD₆₀₀ de 0,4, momento en el cual se indujo la expresión de xRIC-8 con IPTG a una concentración de 50 µM por 2 horas a la misma temperatura.

Posteriormente, las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 5.000 rpm (rotor Sorvall GSA) por 10 min, resuspendidas en 30 mL de “*buffer A*” y sometidas a lisis por sonicación, usando 7 pulsos de 30 segundos cada uno a 60% de amplitud, con intervalos de 30 segundos de recuperación. La fracción soluble fue obtenida por centrifugación a 30 min a 14.000 rpm (rotor Sorvall SS-34) y el sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado por 1 hora a 100.000 x g. Este último sobrenadante está enriquecido en proteína recombinante.

Una columna cromatográfica con 3 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) fue equilibrada con 5 volúmenes de “*buffer A*” y luego cargada con el sobrenadante obtenido en la etapa previamente descrita. La columna fue lavada con 5 volúmenes de “*buffer A*” y posteriormente fue eluída con el “*buffer B*”. 10 fracciones de 1 mL fueron colectadas y 5 µL de cada una fueron analizadas mediante SDS-PAGE e inmuno detección para verificar la presencia de xRIC-8.

Las fracciones eluidas desde la cromatografía de afinidad IMAC que contenían xRIC-8 fueron colectadas y concentradas en tubos “centricon”, cambiado el medio a “*buffer F*” mediante sucesivos lavados del tubo “centricon”.

Para obtener xRIC-8 con un nivel de pureza mayor al 95%, se realizó una segunda cromatografía, correspondiente a intercambio iónico. Una columna HiLoad Q sefarosa (General Electric) fue equilibrada con el “*buffer F*”. La muestra, proveniente de la cromatografía IMAC, fue cargada a un flujo constante de 1 mL/min y luego fue eluída en un gradiente lineal entre “*buffer F*” y “*buffer G*” en un tiempo de 100 min. Se colectaron fracciones de 1 mL y 10 µL de cada una fueron analizadas mediante SDS-PAGE e inmunodetección para verificar la presencia y el grado de pureza de xRIC-8.

Las fracciones puras en xRIC-8, fueron colectadas y concentradas en tubos “centricon”,

para luego ser almacenadas a 4 °C.

3.2.- Caracterización estructural de xRIC-8 mediante dicroísmo circular

La determinación experimental del porcentaje de estructura secundaria de xRIC-8 y de termo estabilidad de la proteína fue realizada por la técnica de dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular fueron obtenidos en el rango de longitud de onda entre 200-250 nm con incrementos de 0,1 nm a una velocidad de 50 nm/min en un equipo Espectropolarímetro Jasco J-715. La concentración de xRIC-8 fue de 0,141 mg/mL en “buffer de muestra”. Se usó una cubeta de cuarzo de 0,1 cm de paso óptico y 300 µL de volumen de muestra. A los espectros se les sustrajo el valor contribuido por el buffer, y los valores de dicroísmo circular(CD) fueron transformados a unidades MRE (del inglés “Mean Residue Ellipticity”) con la siguiente ecuación:

$$MRE = \frac{CD}{M * I * aa}$$

“CD” indica los valores de elipticidad entregados por el espectropolarímetro, “M” es la concentración molar de la proteína, “I” es el ancho de cubeta en milímetros, y “aa” son el número de aminoácidos de la proteína en estudio. De este modo, usando el software SOMCD (Unneberg y col, 2001) se estimó el porcentaje de estructura secundaria presente en la proteína purificada.

Los estudios de termo estabilidad de xRIC-8 se realizaron siguiendo la señal de CD a λ 222 nm, en el mismo *buffer* usado para la obtención de los espectros de CD, entre un rango de temperatura de 20 y 70 °C . La temperatura fue elevada en intervalos de 0,1 °C a una razón de 2 °C/min usando un controlador de temperatura Efecto-Peltier. La temperatura de fusión del estado desplegado de la proteína (T_m) y la entalpía de van't Hoff (ΔH_{VH}) fueron calculadas con el software EXAM (Kirchoff, 1993).

3.3.- Diseño de las mutantes de delección de xRIC-8

Las mutantes de delección de xRIC-8 se diseñaron basadas en el modelo 3D propuesto, eliminando sucesivamente dominios armadillo desde la región carboxilo hacia la región amino.

Se diseñaron 4 delecciones, que se denominaron ΔH , $\Delta 10$, $\Delta 10-9$ y $\Delta 10-9-8$, correspondientes a la eliminación de la última hélice presente en el modelo (H); dominio N° 10 (10); dominios armadillo N° 10 y 9 (10 y 9); o los 3 últimos dominios armadillo N° 10, 9 y 8 (10, 9 y 8).

Las mutantes de delección fueron diseñadas para ser expresadas tanto en sistemas procariontes como eucariontes. Las mutantes fueron obtenidas mediante la técnica de PCR, usando los oligonucleótidos anti sentido 1, 2 y 3, y el oligonucleótido sentido 7 para subclonamiento en el vector pQE80L de expresión procarionte. Los oligonucleótidos anti sentido 4, 5 y 6, y el oligonucleótido sentido 8, fueron usados para amplificar las mutantes de delección posterior subclonamiento en el vector pCS2+6myc, de expresión eucarionte.

Los productos de PCR fueron purificados desde el gel de agarosa y subclonados en el vector TOPO® como vector de pasaje. Para el subclonamiento en el vector de expresión procarionte pQE80L, la construcción “TOPO-mutante de delección” fue digerida con las enzimas KpnI y BamHI; y las enzimas KpnI y XhoI para el subclonamiento en el vector de expresión eucarionte. El fragmento de ADN liberado fue visualizado mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y purificados desde el mismo gel.

3.4.- Expresión y purificación de las mutantes de delección de xRIC-8

Las mutantes de delección, subclonadas en el vector pQE80L, fueron expresadas y purificadas utilizando el mismo protocolo descrito para xRIC-8.

3.5.- Caracterización estructural de las mutantes de delección mediante dicroísmo circular

La mutante de delección ΔH fue caracterizada mediante dicroísmo circular, utilizando el mismo protocolo utilizado para xRIC-8.

4.- Análisis de la actividad GEF de xRIC-8 y de diferentes regiones de la proteína

4.1.- Expresión y purificación de G α s

2 L de medio cultivo LB/Amp fueron inoculados con bacterias *E. coli* BL21(DE3) previamente transformadas con el plásmido pQE80L-G α s, y cultivadas a 30 °C hasta una OD₆₀₀ = 0,6, momento en el cual se adicionó el inductor IPTG a una concentración de 50 μ M por 3 horas a 30 °C. Posteriormente las bacterias se colectaron por centrifugación y se suspendieron en 20 mL de “buffer C”. Las bacterias se lisaron por sonicación, usando 7 pulsos de 30 segundos cada uno a 60% de amplitud, con intervalos de 30 segundos de recuperación. La fracción soluble fue obtenida mediante centrifugación por 30 min a 14.000 rpm y el sobrenadante obtenido fue ultracentrifugado por 1 hora a 100.000 x g. El sobrenadante, rico en proteína recombinante, fue usado en los pasos posteriores de purificación.

Una columna cromatográfica con 3 mL de resina Ni-NTA (Qiagen) fue equilibrada con 5 volúmenes de “buffer C” y luego cargada con el sobrenadante obtenido en la etapa previamente descrita. La columna fue lavada con 5 volúmenes con “buffer D”. Posteriormente fue eluída con el “buffer E”. Se colectaron 10 fracciones de 1 mL y 5 μ L de cada una fueron analizadas mediante SDS-PAGE e inmuno detección para verificar la presencia de G α s. Las fracciones enriquecidas en G α s fueron colectadas y utilizadas en el siguiente paso de purificación.

Las fracciones eluidas desde la cromatografía de afinidad y que contenían G α s se

aplicaron a una columna cromatográfica de intercambio iónico aniónica HiLoad Q sefarosa (General Electric), equilibrada con “buffer F”. El protocolo utilizado fue el mismo que se usó para la purificación de xRIC-8, es decir, se realizó la elusión con un gradiente lineal entre “buffer F” y “buffer G” en un tiempo de 100 min. Fracciones de 1 mL fueron colectadas y 10 μ L de ellas fueron analizadas mediante SDS-PAGE e inmunodetección para verificar la presencia y pureza de G α s.

Las fracciones enriquecidas en G α s, fueron colectadas y concentradas en tubos “centricon”, para luego ser almacenadas a 4 °C hasta su utilización.

4.2.- Análisis de la actividad GEF *in vitro* por fluorescencia de triptófanos

La actividad GEF fue determinada siguiendo la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de G α s. Para esto, se incubó G α s 0,5 μ M con xRIC-8 1 y 1,5 μ M en “buffer A” en un volumen final de 1 mL. El fluorímetro (Espectrofluorímetro RF-5301PC (Shimadzu)) se programó para emitir a longitud de onda de 290 nm y colectar la fluorescencia a 340 nm en tiempo continuo de 1.200 segundos a 20 °C.

Para el procesamiento de los datos, se colectó la fluorescencia del “buffer A” con xRIC-8 incluido, con el objeto de eliminar la contribución de xRIC-8 en la fluorescencia de triptófanos dada por G α s.

4.3.- Análisis de la actividad GEF *in vitro* por fluorescencia de GTP- γ -S-BODIPY®

La determinación de actividad GEF fue medida por el intercambio de GDP por GTP- γ -S-BODIPY®. Para ello se incubaron G α s 2 μ M y xRIC-8 4 μ M en “buffer B”, en un volumen final de 80 μ L. El fluorímetro (Espectrofluorímetro Novostar, BMG Labtech, Inc) fue programado

para excitar a una longitud de onda de 485 nm y registrar la fluorescencia a 520 nm cada 30 segundos durante 20 minutos.

4.4.- Análisis de la actividad GEF *in vivo* por la activación de un gen reportero sensible a AMPc

Células HEK293T fueron cultivadas en placas de 12 pocillos hasta una confluencia entre 40-50%. Luego se transfectaron con xRIC-8 o sus mutantes de delección, más los vectores que codifican para el gen reportero Luciferasa, pCreLuc, y para el gen normalizador Renilla, pRen. 24 horas post transfección, el medio de cultivo se cambió por medio DMEM sin suero en presencia de isoprotenerol 10 μ M por 4 horas para estimular la vía dependiente del receptor β -adrenérgico, GPCR acoplado a $G\alpha_s$. Finalmente las células fueron lisadas y tratadas de acuerdo al protocolo del kit “Dual-Luciferase Reporter Assay System” (Promega), y se midió luminiscencia en equipo Victor3 (PerkinElmer). Se midió lumincencia tanto para el gen reportero luciferasa como para el gen normalizador renilla en cada condición. Los valores finales se expresaron como la razón de luciferasa/renilla para cada condición.

4.5.- Análisis de la actividad GEF *in vivo* por el aumento de la concentración intracelular de AMPc

Células HEK293T fueron cultivadas en placas de 12 pocillos hasta una confluencia entre 40-50% y se tranfectaron con xRIC-8 o sus mutantes de delección. 24 horas post transfección, las células fueron estimuladas con isoproterenol 10 μ M durante 15 minutos, luego fueron rápidamente lisadas y tratadas de acuerdo al kit “cAMP HTS Immuassay” (Millipore). Finalmente se midieron las cantidades de AMPc por emisión de luminiscencia en un luminómetro Victor3 (PerkinElmer), y cuantificación por una curva estándar perteneciente al kit.

4.6.- Estudio de la translocación de xRIC-8 y mutantes de delección a la membrana plasmática

La translocación a la membrana plasmática se estudió a través de inmunocitoquímica y microscopía confocal.

Células HEK293T fueron cultivadas en placas de 12 pocillos hasta una confluencia entre 30-40% y luego transfectadas con xRIC-8 o las mutantes de delección. En cada pocillo fue depositado previamente un cubreobjetos de vidrio, con el fin de servir como matriz para desarrollar la técnica de inmunocitoquímica.

Las células se transfectaron y 24 horas post transfección fueron incubadas por 0, 15', 30', 1 hr, 2hr, 3hr y 4hr en medio DMEM libre suero con 10 μ M de isoproterenol. A los tiempos indicados, las células fueron fijadas en PBS/paraformaldehído 4% a temperatura ambiente por 30 min. Los cubre objetos con las células fueron lavados 2 veces por 10 min con PBS pH 7,4. Luego, las células fueron permeabilizadas con PBS/Tritón X100 0,1 % por 10 min a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron nuevamente 2 veces por 10 min con PBS. Los cubreobjetos fueron incubados con el 1er anticuerpo (anti Myc, diluido en PBS 1:250) en cámara húmeda toda la noche. Luego se lavaron los cubreobjetos con PBS 3 veces por 10 min, y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti conejo conjugado a fluoróforo, diluido en PBS 1:250) y la solución de TOPRO (1:1.000 en PBS) en una cámara húmeda y oscuridad por 2 horas. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces por 10 min en PBS y se montaron en un portaobjetos con líquido de montaje DAKO. Las muestras se almacenaron en oscuridad a 4 °C hasta su observación por microscopio confocal.

Para verificar si la translocación es mediada por la interacción entre xRIC-8 o mutantes de delección y G α s, se analizó dicha interacción a través de co inmuno precipitación.

Las células HEK 293T sin transfectar o luego de 12 horas post transfección transiente,

fueron lisadas en *buffer* de lisis con inhibidores de proteasas 1X y centrifugadas a baja velocidad (2.000 x g por 5 minutos a 4°C). Entre 300 y 600 µg de proteína total soluble fueron incubados con 5 µg de anticuerpo anti Myc (Santa Cruz), 5 µg de IgG no relacionada de ratón (Santa Cruz) o sin anticuerpo y llevada hasta un volumen de 500 µL con *buffer* de lavado (0,1% NP40; 20 mM Hepes pH 7,9; 1 mM DTT; 150 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM EDTA y 1X coctel de inhibidores de proteasas) e incubada en rotación permanente durante 3 horas a 4°C. Posteriormente, se agregaron 20 µL de Proteína A agarosa (Pierce), previamente lavada 3 veces con el mismo *buffer*, y se incubó durante 1,5 horas a 4°C bajo rotación. Finalmente, el material fue lavado 4 veces con *buffer* de lavado y suspendido en 10 µL de *buffer* de carga 3X con DTT para su posterior análisis por “western blot”.

V. RESULTADOS

V.1.- Análisis bioinformático de la proteína xRIC-8

1.- Búsqueda de dominios, motivos y predicción de estructura secundaria

xRIC-8 fue previamente clonada en nuestro laboratorio (Romo y col, 2008) y su secuencia fue depositada en la base de datos del NCBI bajo el código AAZ23806. Utilizando esta información, el estudio correspondió a analizar la estructura primaria de xRIC-8 en busca de algún indicio estructural común con alguna otra proteína previamente caracterizada y que diera cuenta de las funciones de xRIC-8, en especial la función GEF.

Estudios realizados con la herramienta BLAST indicaron que xRIC-8 pertenece a una familia de proteínas única, formando un “cluster” cerrado que no presenta homología o similitud con algún otro tipo de proteínas, cuya estructura terciaria sea conocida o no. La **Tabla I** muestra el resultado de BLAST con los primeros 40 mejores puntajes (“Score”) encontrados, donde todos ellos corresponden a proteínas de la familia RIC-8 de distintas especies.

Dado el resultado entregado por BLAST, se analizó la estructura primaria en busca de algún dominio en ella. Para esto, usamos los servidores SMART e InterProScan, no obstante, este análisis no entregó ningún resultado positivo en la búsqueda, lo que indicó que xRIC-8 además de no poseer homología o similitud con otra proteína conocida, un análisis minucioso de su secuencia indicaba que tampoco posee algún dominio o motivo inferido solo a partir de su secuencia utilizando estas técnicas.

Por otro lado, una predicción de estructura secundaria mostró que xRIC-8 es una proteína con un alto contenido helicoidal (**Figura 4**), siendo este tipo de estructura secundaria la única presente en esta proteína.

Un alineamiento múltiple entre las proteínas RIC-8, mostró que éstas presentan una mayor conservación hacia la región carboxilo terminal, mientras que hacia la región amino son

UniProt	Nombre Común de la Proteína	Score	E-Value
Q45TX8	RIC8A_XENLA Synembryn-A (Protein Ric-8A) [ric8a]	976	0.0
Q5XGL7	XENLA LOC495192 protein [ric8a] [Xenopus laevis	968	0.0
Q6P4W7	RIC8A_XENTR Synembryn-A (Protein Ric-8A) [ric8a]	932	0.0
Q5ZL77	RIC8A_CHICK Synembryn-A (Protein Ric-8A) [RIC8A]	698	0.0
A7M747	DANRE Resistance to inhibitors of cholinesterase	657	0.0
Q642H7	RIC8A_DANRE Synembryn-A (Protein Ric-8A) [ric8a]	657	0.0
A9JTE4	DANRE Zgc:92294 [zgc:92294] [Danio rerio (Zebra	657	0.0
Q4RZH0	TETNG Chromosome undetermined SCAF14926, whole g	537	e-150
Q3TIR3	RIC8A_MOUSE Synembryn-A (Protein Ric-8A) [Ric8a]	536	e-150
D2I614	AILME Putative uncharacterized protein (Fragment	533	e-149
B1H241	RAT Resistance to inhibitors of cholinesterase 8	532	e-149
Q4R720	RIC8A_MACFA Synembryn-A (Protein Ric-8A) [RIC8A]	531	e-149
Q80ZG1	RIC8A_RAT Synembryn-A (Protein Ric-8A) [Ric8a] [528	e-148
Q9NPQ8	RIC8A_HUMAN Synembryn-A (Protein Ric-8A) [RIC8A]	525	e-147
Q5R8F5	RIC8A_PONAB Synembryn-A (Protein Ric-8A) [RIC8A]	525	e-147
Q5E9J8	RIC8A_BOVIN Synembryn-A (Protein Ric-8A) [RIC8A]	524	e-146
Q9NPQ8	3 Isoform 3 of Synembryn-A OS=Homo sapiens GN=RI	519	e-145
Q9NPQ8	2 Isoform 2 of Synembryn-A OS=Homo sapiens GN=RI	488	e-136
Q6DRJ9	RIC8B_DANRE Synembryn-B (Protein Ric-8B) (Synemb	444	e-122
Q1JQ20	DANRE Synembryn-like [synbl] [Danio rerio (Zebra	444	e-122
D2HXV4	AILME Putative uncharacterized protein (Fragment	444	e-122
Q1LWD2	DANRE Novel protein (Synembryn-like) [synbl] [Da	444	e-122
Q80XE1	RIC8B_MOUSE Synembryn-B (Protein Ric-8B) [Ric8b]	442	e-122
B7WPL0	HUMAN Putative uncharacterized protein RIC8B [RI	442	e-122
Q5R7P0	PONAB Putative uncharacterized protein DKFZp469H	441	e-122
D4AD72	RAT Putative uncharacterized protein Ric8b (Resi	441	e-121
Q9NVN3	RIC8B_HUMAN Synembryn-B (Brain synembrin) (hSyn)	416	e-114
Q9NVN3	2 Isoform 2 of Synembryn-B OS=Homo sapiens GN=RI	415	e-114
Q9NVN3	3 Isoform 3 of Synembryn-B OS=Homo sapiens GN=RI	397	e-108
Q4S7H1	TETNG Chromosome 13 SCAF14715, whole genome shot	390	e-106
Q4RVK9	TETNG Chromosome 15 SCAF14992, whole genome shot	372	e-101
A2RTZ0	HUMAN Resistance to inhibitors of cholinesterase	359	5e-97
Q80XE1	2 Isoform 2 of Synembryn-B OS=Mus musculus GN=Ri	359	5e-97
Q80ZG0	RIC8B_RAT Synembryn-B (Protein Ric-8B) [Ric8b] [358	1e-96
C3Y504	BRAFL Putative uncharacterized protein [BRAFLDRA	340	3e-91
Q4TDS8	TETNG Chromosome undetermined SCAF6065, whole ge	273	5e-71
Q7Q230	ANOGA AGAP010793-PA [AGAP010793] [Anopheles gamb	243	3e-62
Q16VZ5	AEDAE Synembryn [AAEL009415] [Aedes aegypti (Yel	237	3e-60
B0X751	CULQU Synembryn [CpipJ_CPIJ015039] [Culex quinqu	227	2e-57
B4M1J0	DROVI GJ18843 [GJ18843] [Drosophila virilis (Fru	224	2e-56

Tabla I. Análisis de BLAST usando la secuencia de xRIC-8. Se muestran los primeros 40 resultados de este análisis. Todas las proteínas listadas son miembros de la familia RIC-8. La columna UniProt muestra los códigos para esta base datos.



Figura 4. Predicción de estructura secundaria para xRIC-8. Usando el servidor Psipred, se obtuvo el patrón de estructura secundaria a lo largo de la secuencia de xRIC-8. Los cilindros rojos indican estructuras helicoidales y las flechas azules indican estructuras extendidas.

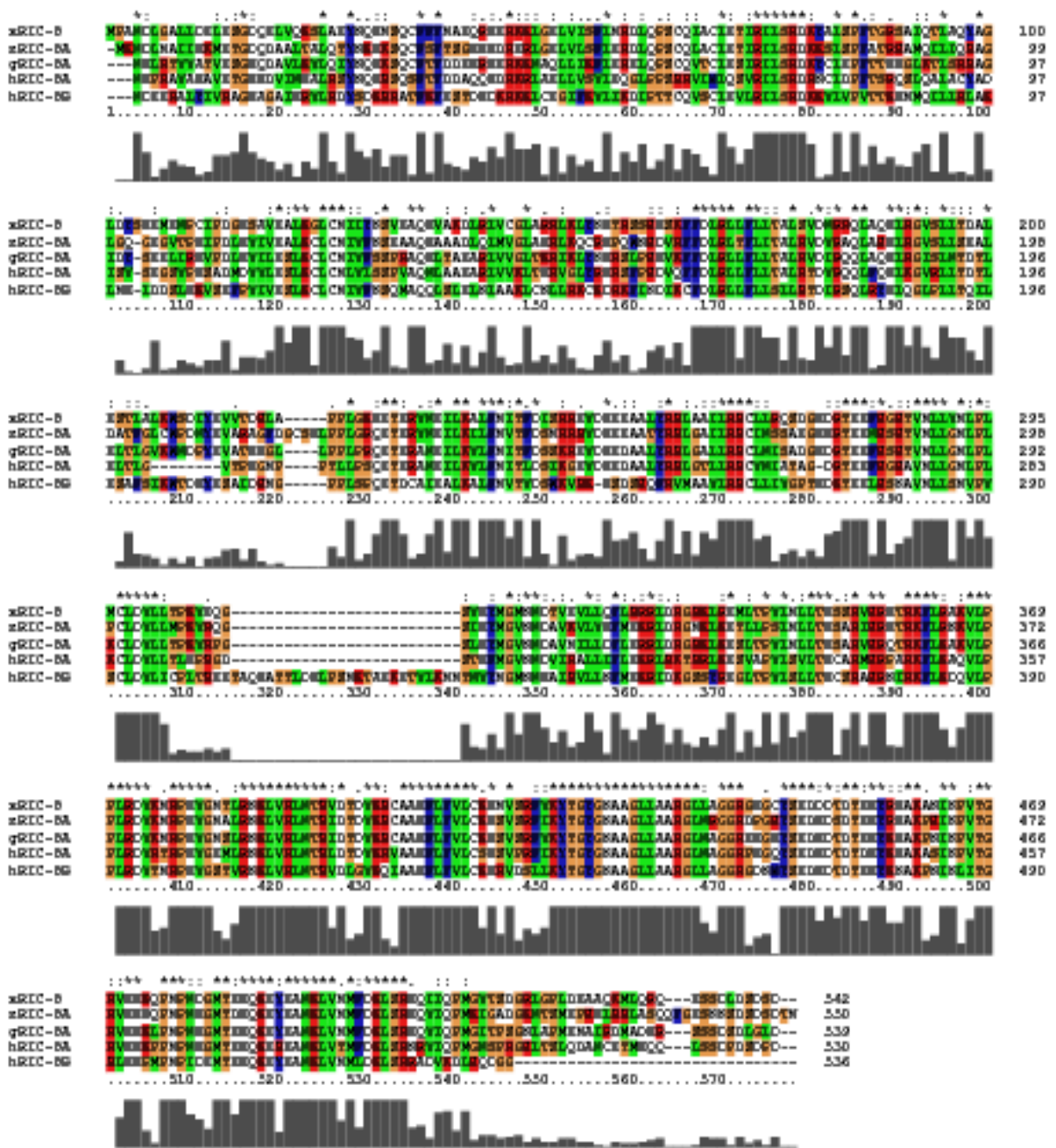


Figura 5. Alineamiento múltiple entre distintas proteínas RIC-8. RIC-8 de *X. laevis*, *D. rerio*, *G. gallus* y *H. sapiens* fueron alineadas. El alineamiento muestra una alta conservación hacia la región carboxilo terminal, tal y como lo muestran las identidades de los aminoácidos, dadas por las columnas de igual color y los asteriscos sobre ellas.

más variables (**Figura 5**).

Los resultados entregados por los análisis de BLAST, SMART e InterProScan, junto con la predicción de estructura secundaria, así como también el alineamiento múltiple entre proteínas RIC-8, indican que xRIC-8 es una proteína con actividad GEF, cuyo dominio con dicha actividad no es reconocible por un simple análisis de secuencia; posee un elevado contenido helicoidal y que no presenta similitud de secuencia con alguna otra familia de proteínas.

2.- Reconocimiento de plegamiento

Se evaluó a través de la aproximación bioinformática de “reconocimiento de plegamiento” si xRIC-8 adquiere uno de los plegamientos conocidos. El estudio se realizó en cinco servidores web distintos. Este análisis entregó como resultado que xRIC-8 posee un plegamiento conocido, denominado “armadillo” de la familia de las alfa-alfa súper hélices. La **Tabla II** muestra los primeros cinco resultados de cada servidor usado en este análisis, remarcándose aquellos que muestran a xRIC-8 como una proteína miembro de la familia armadillo.

El dominio armadillo posee un largo promedio de 42 amino ácidos; está compuesto de 3 hélices denominadas H1, H2 y H3, conectadas entre sí por loops de largo variable, en especial el que conecta las hélices H2 y H3; y que espacialmente forman un triángulo que gira en sentido horario desde el amino terminal hacia carboxilo terminal (**Figura 6**, Andrade y col, 2001). Las proteínas que presentan plegamiento tipo armadillo, poseen a lo menos cuatro de estos dominios en tandem, formando una estructura helicoidal súper enrollada sobre sí misma, de largo variable (Andrade y col, 2001; Coates, 2003). Funcionalmente hablando, estas proteínas se caracterizan por tener la capacidad de interactuar con varias proteínas, atribuyéndoseles actividad “scaffold”, y lo más interesante es que se han reportado proteínas con este tipo de plegamiento que poseen actividad GEF sobre proteínas G pequeñas (Shimizu y col, 1996). Todas estas

Método					
Ranking	HHPRED	I-TASSER	3D-JURY	PSIPRED	SP4
1	β-catenina (2z6h)	α-importina (1ejl)	β-catenina (1jdh)	α-importina (2j dq)	plakofilina 1 (1xm9)
2	α-importina (1y2a)	β-catenina (1jdh)	β-catenina (1i7w)	plakofilina 1 (1xm9)	α-importina (1ee4)
3	HSPBP1 (1xqr)	α-importina (1ee4)	α-importina (1q1s)	RSR (2nvo)	β-catenina (1jdh)
4	β-catenina (1jdh)	plakofilina 1 (1xm9)	α-importina (1ial)	PR65a (1b3u)	6-PGDasa (1wdk)
5	α-importina (1j dq)	β -adaptina (1gw5)	α-importina (2j dq)	α-importina (2c1m)	β -adaptina (1gw5)

Tabla II. Reconocimiento de plegamiento para xRIC-8. Se muestran los cinco plegamientos “tops” del ránking generado por cada método de “reconocimiento de plegamiento”. Los códigos PDB de las proteínas son mostrados en paréntesis. Las proteínas destacadas en negrita son aquellas que pertenecen a la familia “repeticiones armadillo”.

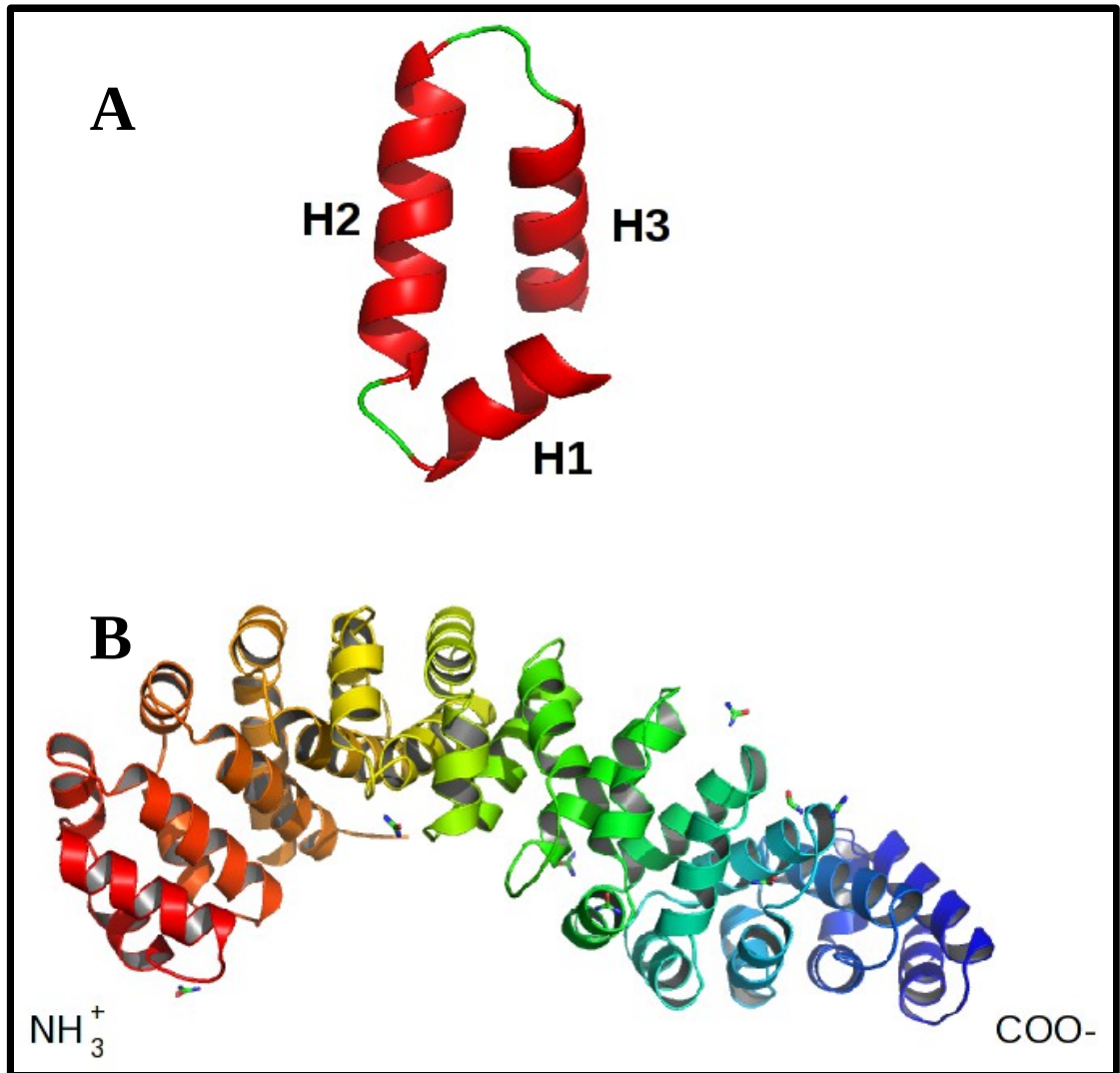


Figura 6. Dominio Armadillo. En **A)** se muestra la configuración espacial del dominio armadillo, compuesto por tres hélices, denominadas H1, H2 y H3, que giran en sentido horario, conectadas por “loops”. **B)** Muestra la distribución de estos dominios en una proteína, donde se agrupan en repeticiones de a lo menos cuatro, formando una estructura super helicoidal de giro a la derecha (β -catenina, código PDB: 1JDH).

características son comunes a las proteínas RIC-8.

3.- Construcción de modelo 3D para xRIC-8

Con la información obtenida a partir del estudio de “reconocimiento de plegamiento”, se decidió realizar el 1er modelo tridimensional para una proteína RIC-8. Para ello, se utilizaron dos aproximaciones:

- 1) Modelaje molecular basado en un templado “armadillo”, con el software Modeller
- 2) Modelaje molecular automatizado con el servidor i-Tasser

Para el primer caso, se usó como templado la estructura de β -catenina depositada en el Protein Data Bank bajo el código 1JDH, templado obtenido a partir del reconocimiento de plegamiento con el servidor 3D-Jury. A su vez, en este servidor web se encuentra disponible el uso del software Modeller para usuarios que posean una licencia válida, permitiendo realizar un modelaje automatizado en dicho servidor. Esto posibilitó la generación de un modelo 3D para xRIC-8.

Por otro lado, el servidor web i-Tasser es reconocido en la actualidad como la mejor herramienta en la predicción de estructura basada en su secuencia por la técnica de “threading”. Utilizando esta herramienta se logró predecir un plegamiento completo de la proteína y generar un modelo 3D para xRIC-8.

Para discriminar entre ambos modelos, estos fueron analizados con el software ProSA II, el cual evalúa estructura de proteínas, en especial de modelos (**Figura 7**). El resultado de ProSA II indicó que el modelo generado por Modeller posee un “z-score” de -4.9 y que solo un 60% de los aminoácidos presentaron una energía favorable; por otra parte, el modelo generado por i-Tasser posee un “z-score” de -6.38, valor más esperado para una proteína de 542 aminoácidos; además, un análisis de energía por residuo mostró que el 80% de ellos poseen una energía

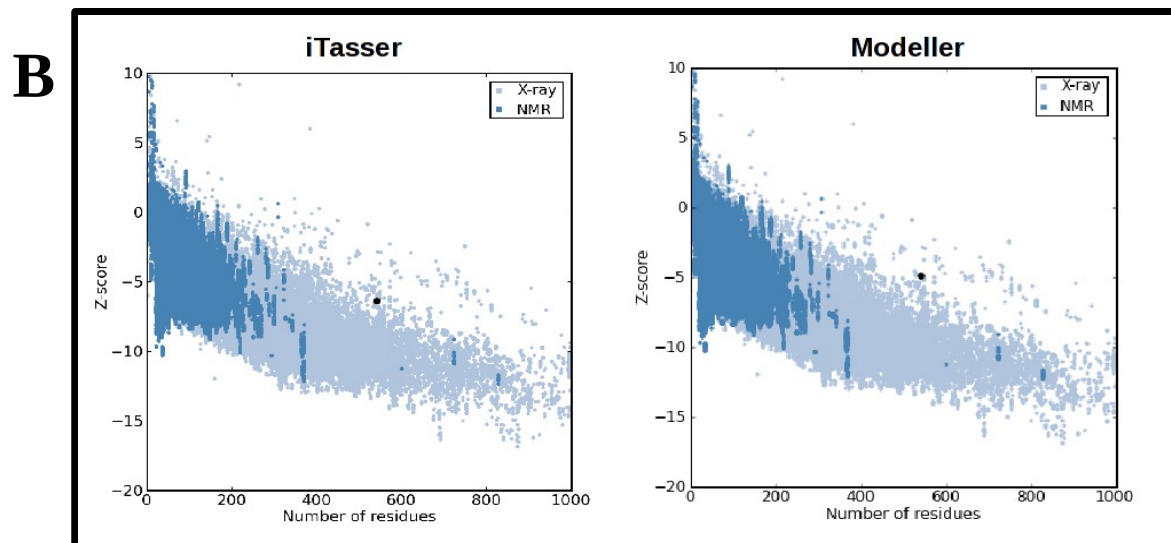
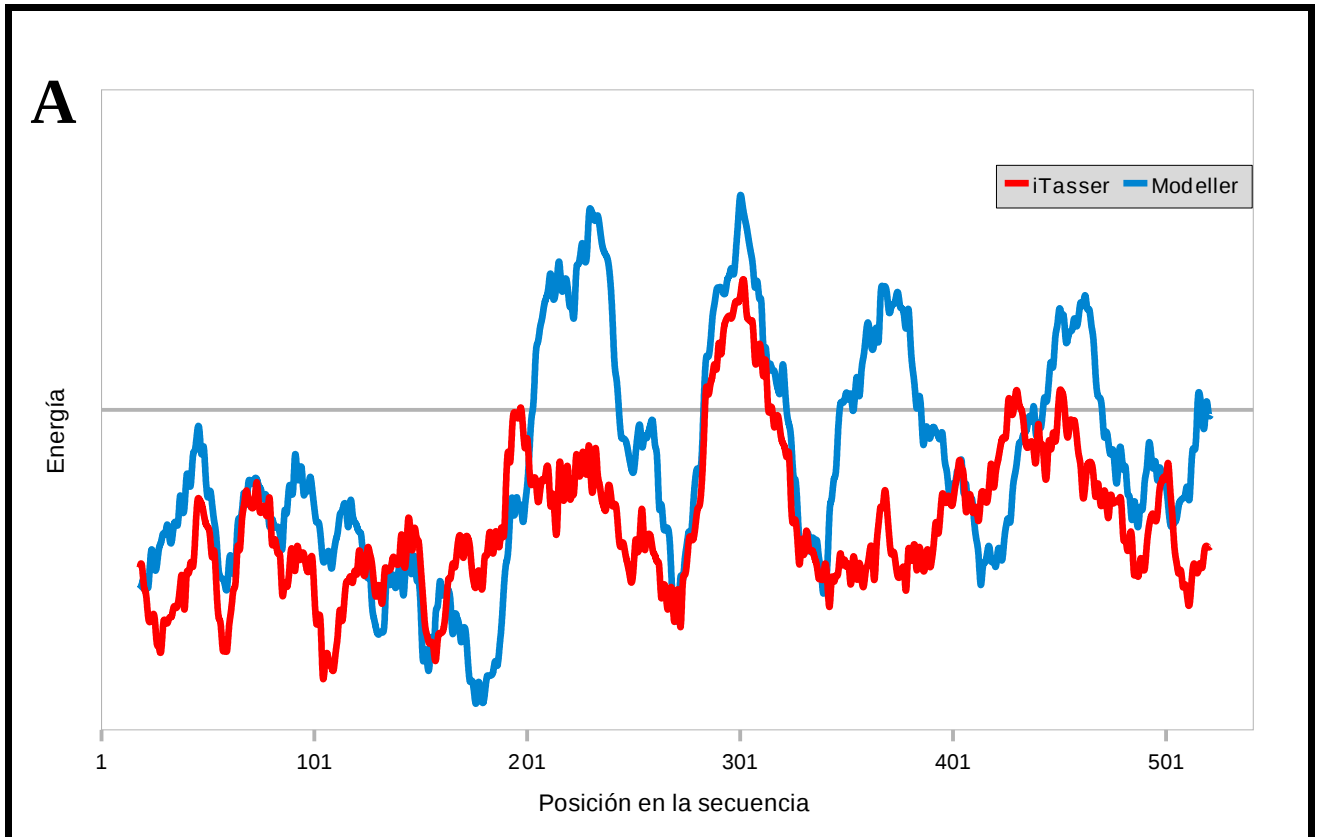


Figura 7. Evaluación de modelos 3D para xRIC-8 generados con iTasser y Modeller usando el software ProSA II. A) Evaluación energética a lo largo de la secuencia, identificando regiones con errores. Se observa que el modelo generado por iTasser es energéticamente más favorable, al presentar la mayoría de los residuos en una conformación energética menor (valores bajo la línea de corte negra). **B)** Muestra el valor de “z-score” para cada modelo, comparado con los presentes en proteínas cuya estructura fue determinada experimentalmente.

favorable (valores bajo el umbral). Esto permitió elegir como modelo definitivo aquel generado por i-Tasser, descartando el modelo generado por Modeller.

El modelo 3D propuesto para xRIC-8 presenta 10 repeticiones armadillo, abarcando el total de la proteína. La **Figura 8A** muestra una representación en cintas de este modelo tridimensional, en la cual es posible apreciar el alto contenido helicoidal presente. La **Figura 8B** es una vista detallada de cada uno de los dominios armadillos presentes en xRIC-8, donde se muestra la conservación del motivo de leucina presente en cada dominio armadillo, y que es característico de ellos.

Un cálculo de potencial electrostático de superficie con el software APBS sobre el modelo propuesto, mostró que la distribución de cargas sobre la superficie de la proteína no es homogénea (**Figura 9**), encontrándose regiones extensas ricas en cargas negativas (color rojo en la figura) y otras zonas, menores, ricas en cargas positivas (color azul en la figura).

Los dominios armadillos son caracterizados por un alto contenido en residuos de leucina, por lo que son llamados también “dominios ricos en leucinas”. Un análisis simple del contenido de leucinas presentes en xRIC-8, mostró que ésta presenta un total de 78 leucinas, que corresponde al 14.4% de los amino ácidos totales. En comparación, β -catenina (código PDB 2ZSH) presenta un valor de 13,4%, valor muy cercano al contenido reportado para xRIC-8 en esta tesis. Además, es característico que un par de leucinas ubicadas en las hélices H2 y H3 interaccionen entre sí, situación que está conservada en los armadillos del modelo para xRIC-8 (**Figura 8B**).

La evaluación estructural del modelo mostró que este posee una conformación válida tanto energética como estereoquímica, como lo muestran los análisis realizado con ProSA II (Wiederstein y Sippl, 2007) y con el gráfico de Ramachandran (Lovell y col, 2002) (**Figuras 7 y 10**). El gráfico de Ramachandran indicó que sobre el 90% de los residuos están en una

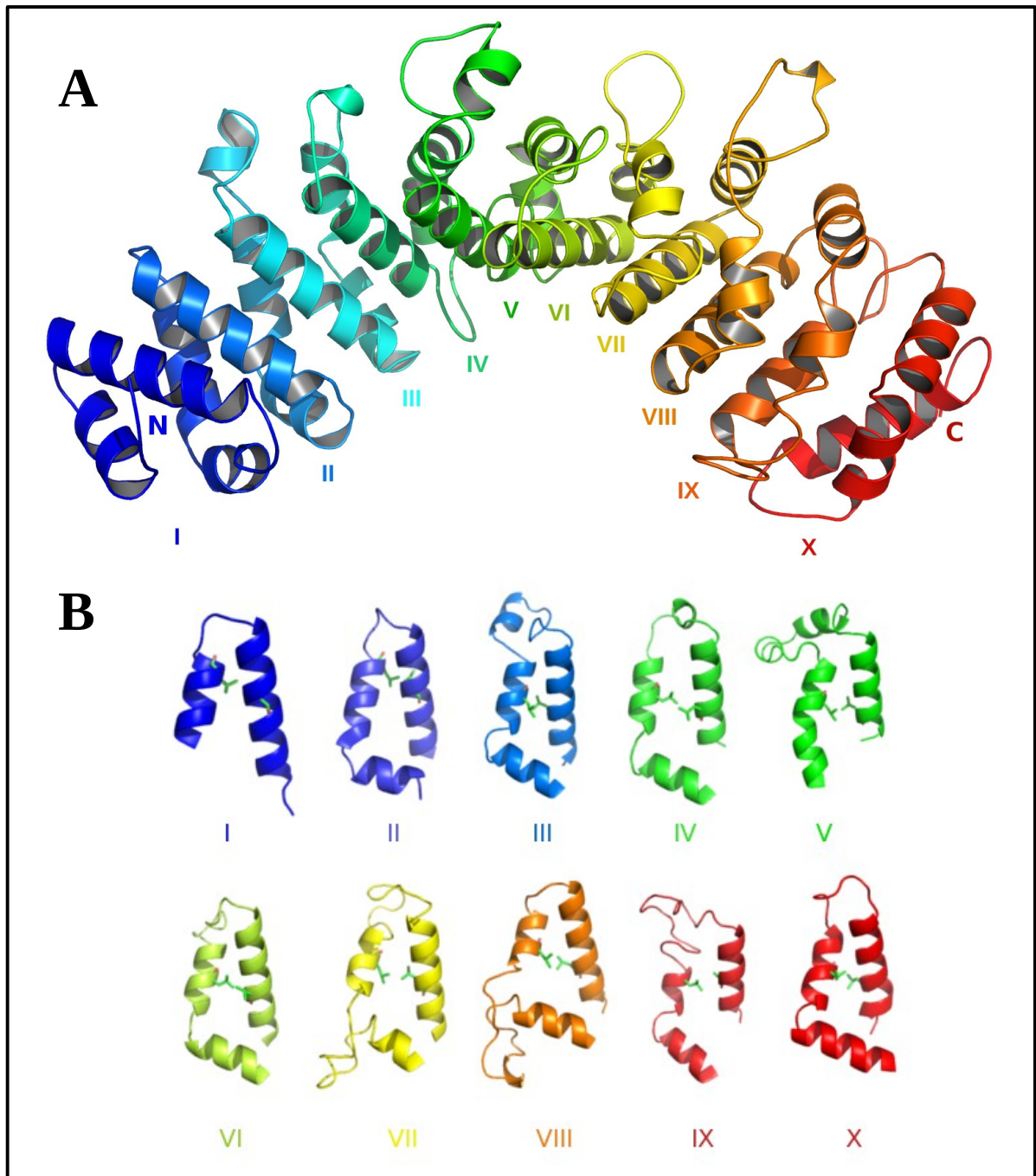


Figura 8. Modelo 3D de xRIC-8. A) Representación en cintas del modelo generado con iTasser, donde se pueden apreciar las 10 repeticiones armadillos, demarcadas por los números romanos y en distintos colores, distribuyéndose completamente en la proteína desde el extremo amino al carboxilo. B) Representación en cinta de los dominios armadillo, donde se aprecian las conformaciones de las hélices H1, H2 y H3 en cada uno de ellos, además se presentan en “sticks” el motivo de leucinas presente característicamente en este tipo de plegamiento.

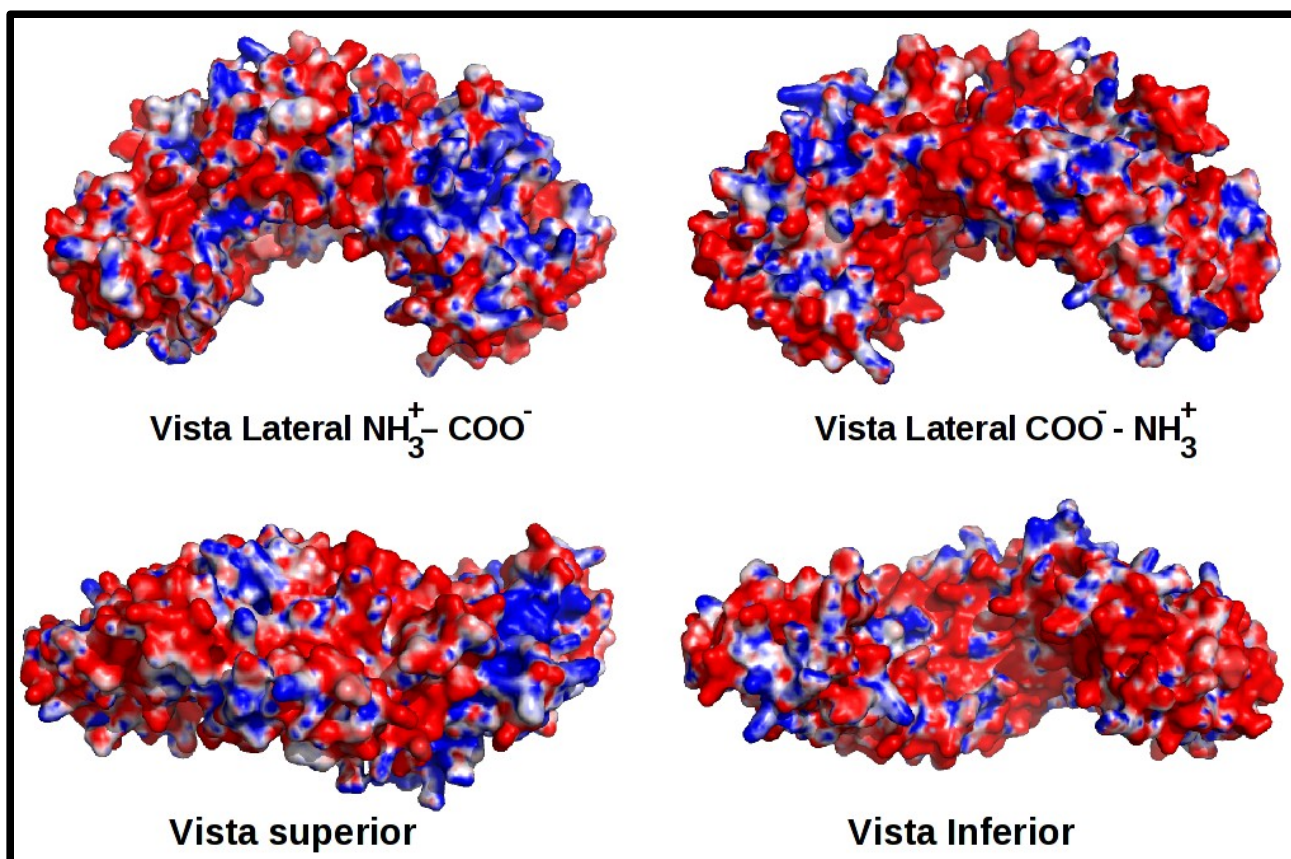


Figura 9. Representación de potencial electrostático de superficie de xRIC-8. El modelo 3D de xRIC-8 presenta una distribución de cargas tal que genera zonas altamente electronegativas (regiones en color rojo), así como regiones electropositivas (regiones en color azul). Estas zonas estarían capacitadas para realizar interacciones de tipo transiente con otras proteínas. Las vistas Superior e Inferior están en la orientación de consenso amino – carboxilo terminal, y se han definido como tales en base a la imagen propuesta en la Figura 8.

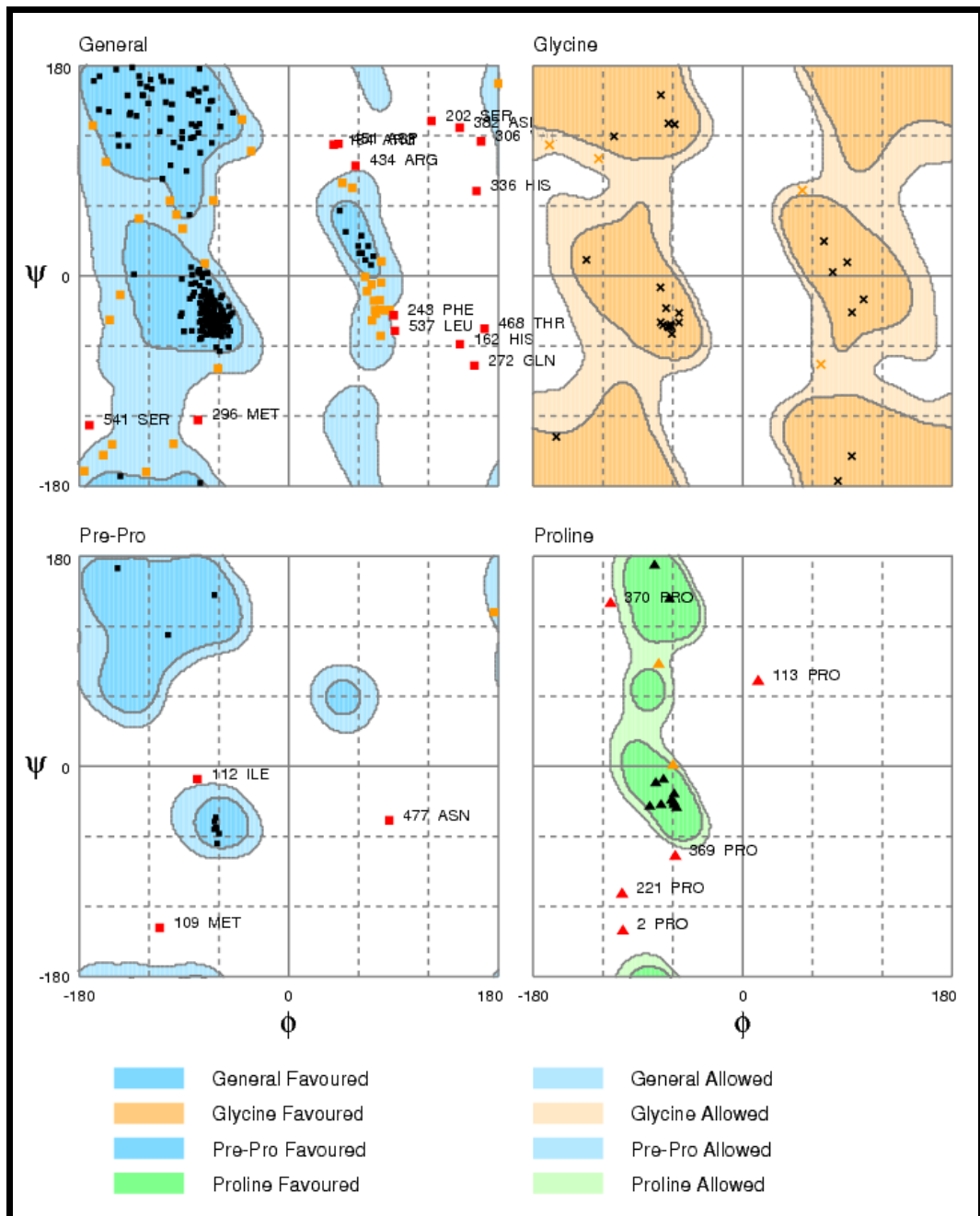


Figura 10. Gráfico de Ramachandran para modelo 3D de xRIC-8. Este análisis muestra que la mayoría de los residuos, sobre el 90% de ellos, están en conformaciones favorables.

conformación aceptada (4% de los residuos están en regiones no permitidas), y que la mayoría de ellos están en la zona correspondiente a una conformación helicoidal, como era esperado.

Un análisis sobre la disposición de los aminoácidos en el modelo mostró que de aquellos que están expuestos al solvente, el 76% son aminoácidos hidrofílicos, mientras que los aminoácidos que no poseen superficie accesible al solvente, el 59% de ellos son hidrófobos. Todos estos valores son muy semejantes a los presentados por β -catenina (obtenidos desde su estructura cristalina), los cuales son 67% y 64%, respectivamente.

En resumen, todas las características juntas apoyan y validan fuertemente el modelo 3D propuesto para xRIC-8, y nos permiten proponer a xRIC-8 como una nueva proteína miembro de la familia Armadillo.

V.2.- Expresión, purificación y caracterización de xRIC-8 y diferentes regiones de la proteína

1.- Expresión de xRIC-8

xRIC-8 fue clonada previamente en nuestro laboratorio desde ovocitos de *X. laevis*, y subclonada en el vector de expresión procarionte pQE81L. Este vector permite expresar xRIC-8 en bacterias, y gracias al epítipo de 6 histidinas que se adiciona a la proteína, es posible detectarla en ensayos de “western blot”, así como también purificarla mediante cromatografía de afinidad.

Los estudios de expresión comenzaron con la búsqueda de la mejor condición, considerando temperatura de inducción, tiempo de inducción y concentración de IPTG, considerando todos estos factores, para obtener la mayor proporción de proteína soluble ausente de productos de degradación. Para ello, se transformó bacterias *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pQE81L-xRIC-8, de acuerdo con el protocolo de “transformación bacteriana mediante

método químico”, y se procedió a estandarizar la condición de “temperatura de inducción” y “concentración de IPTG”. Para ello, se trabajó a 25 y 30 °C, y las bacterias fueron cultivadas en 3 mL de medio líquido LB hasta una OD₆₀₀ de 0,6, momento en el cual se incubaron en presencia del inductor IPTG a 50, 200 y 1000 μM, por un tiempo de 3 horas. Las bacterias se lisaron por sonicación, y se separaron las fracciones solubles de las insolubles por centrifugación. Ambas fracciones fueron analizadas por “western blot”.

Con esta aproximación se determinó como la mejor condición de expresión, la correspondiente a 25 °C y 50 μM de IPTG. Posteriormente, se estandarizó la densidad óptica (OD) del cultivo bacteriano al momento de comenzar la inducción y el tiempo de duración de la misma. Para esto, las bacterias transformadas con el plásmido pQE81L-xRIC-8 fueron cultivadas a 25 °C hasta alcanzar las OD₆₀₀ de 0,4 y 0,8 y se procedió a inducir por 2 y 4 horas con IPTG 50 μM.

Las bacterias fueron procesadas de igual manera que en el caso anterior, obteniendo las fracciones solubles e insolubles. Estas fueron analizadas por “western blot” para encontrar la condición final que, considerando ahora todos los parámetros, dé cuenta de una mayor proporción de xRIC-8 en la fracción soluble y sin degradación. Esto se grafica en la **Figura 11**, la cual resume el estudio de expresión de xRIC-8 en bacterias *E. coli*, y muestra claramente que al cultivar las bacterias hasta una OD₆₀₀ de 0,4, para luego inducir a 25 °C con IPTG 50 μM por 2 horas, se obtiene xRIC-8 en la fracción soluble, completamente ausente de productos de degradación. Este resultado permite tener las condiciones óptimas para purificar xRIC-8 desde bacterias.

2.- Purificación de xRIC-8

Para la purificación de xRIC-8, se utilizaron las condiciones de expresión determinadas en

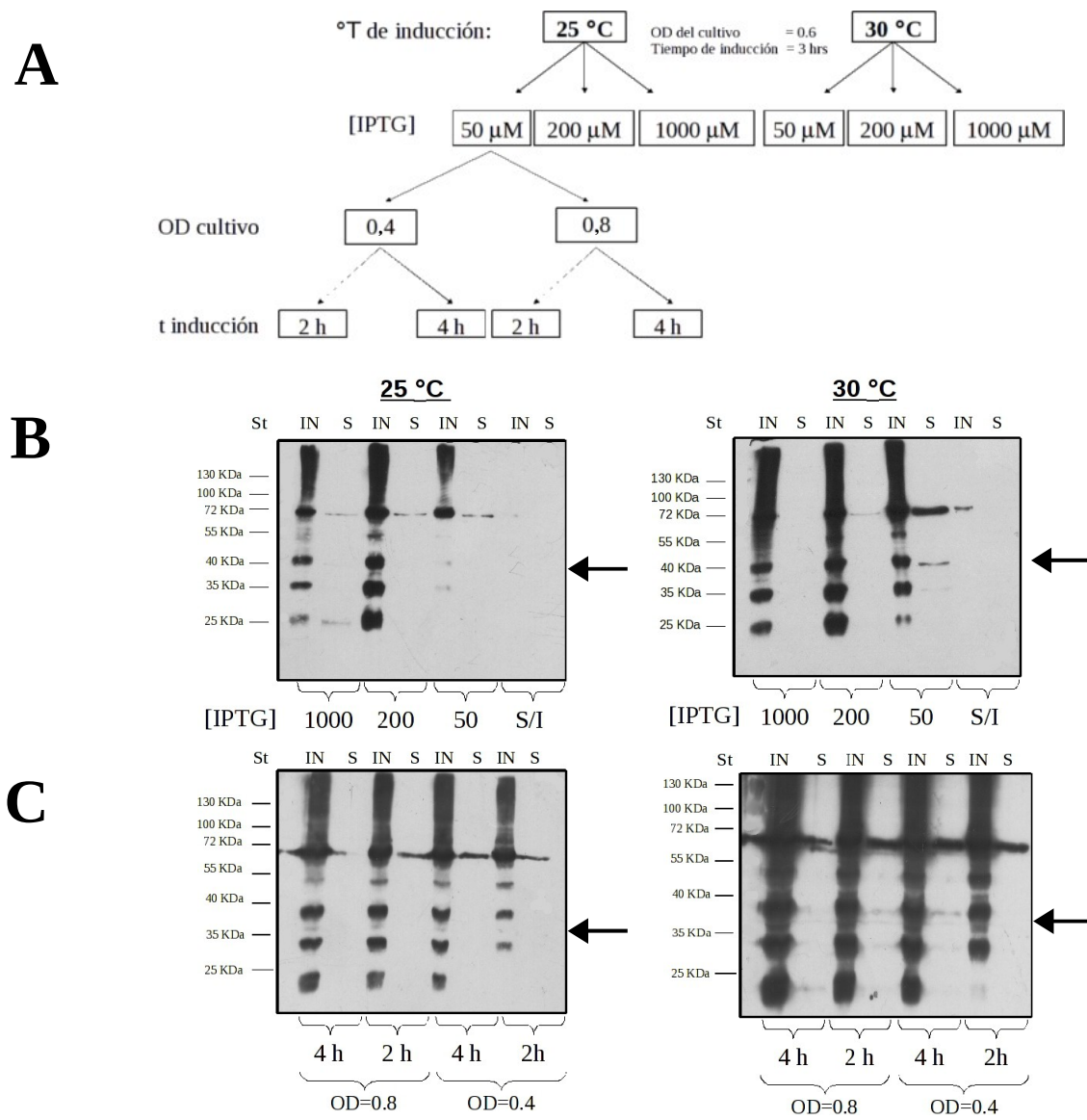


Figura 11. Estandarización de las condiciones de expresión de xRIC-8 en bacterias *E. coli* BL21(DE3). **A)** Esquema de la aproximación experimental usada, donde se indican las temperaturas de inducción utilizadas, OD₆₀₀ del cultivo al momento de ser inducido, concentración del inductor IPTG y tiempo de inducción. **B)** Análisis “western blot” del estudio de expresión a 25 y 30 °C, variando la concentración de IPTG de 50 a 1000 µM. **C)** Análisis “western blot” del estudio a 25 °C, evaluando el tiempo de inducción a 2 y 4 horas, así como también la OD₆₀₀ del cultivo al momento de ser inducido de 0,4 y 0,8; el panel de la derecha es una sobre exposición para mostrar la ausencia de productos de degradación. St: estándar de masa molecular; IN: fracción insoluble del lisado bacteriano, S: fracción soluble del lisado bacteriano. La flecha indica a xRIC-8.

el punto anterior, y se escaló el volumen de cultivo hasta 4 litros.

El procedimiento de purificación se basó en dos etapas cromatográficas, donde la primera de ellas fue una cromatografía de afinidad IMAC (del inglés “Immobilized Metal ion Affinity Chromatography”), gracias al epítipo de 6 histidinas que adiciona el vector pQE81L; y una posterior cromatografía de intercambio aniónico, para eliminar las proteínas contaminantes que co-purificaron con xRIC-8 en la primera cromatografía.

Este procedimiento seriado permitió purificar con un nivel sobre el 95% de pureza para xRIC-8, medida en un análisis SDS-PAGE y corroborada por “western blot” para verificar la ausencia de productos de degradación.

La **Figura 12** corresponde al análisis SDS-PAGE y “western blot” de las fracciones eluidas de la cromatografía IMAC. Se eluyeron 10 fracciones de 1 mL aproximadamente, y aquellas enriquecidas en xRIC-8, que corresponden a las fracciones 2 a 6, fueron colectadas para ser luego procesadas mediante cromatografía de intercambio aniónico.

En la cromatografía de intercambio iónico, se eluyeron 100 fracciones de 1 mL cada una, y con el protocolo utilizado se logró alcanzar un grado de pureza sobre el 95%. Esto se visualiza al observar el cromatograma obtenido, donde se observó un “pick” único, medido por absorbancia a 280 nm, cerca de la fracción N° 47, que representa a xRIC-8 (**Figura 13**). Al analizar las fracciones eluidas mediante SDS-PAGE teñido con azul de coomasie y “western blot”, mostraron claramente la separación de xRIC-8 de otras proteínas que co-purificaban en la cromatografía de afinidad, así como también de productos de degradación (**Figura 14**). Las fracciones que presentan a xRIC-8 pura, fueron colectadas, concentradas en tubos “centricon” y almacenadas a 4 °C.

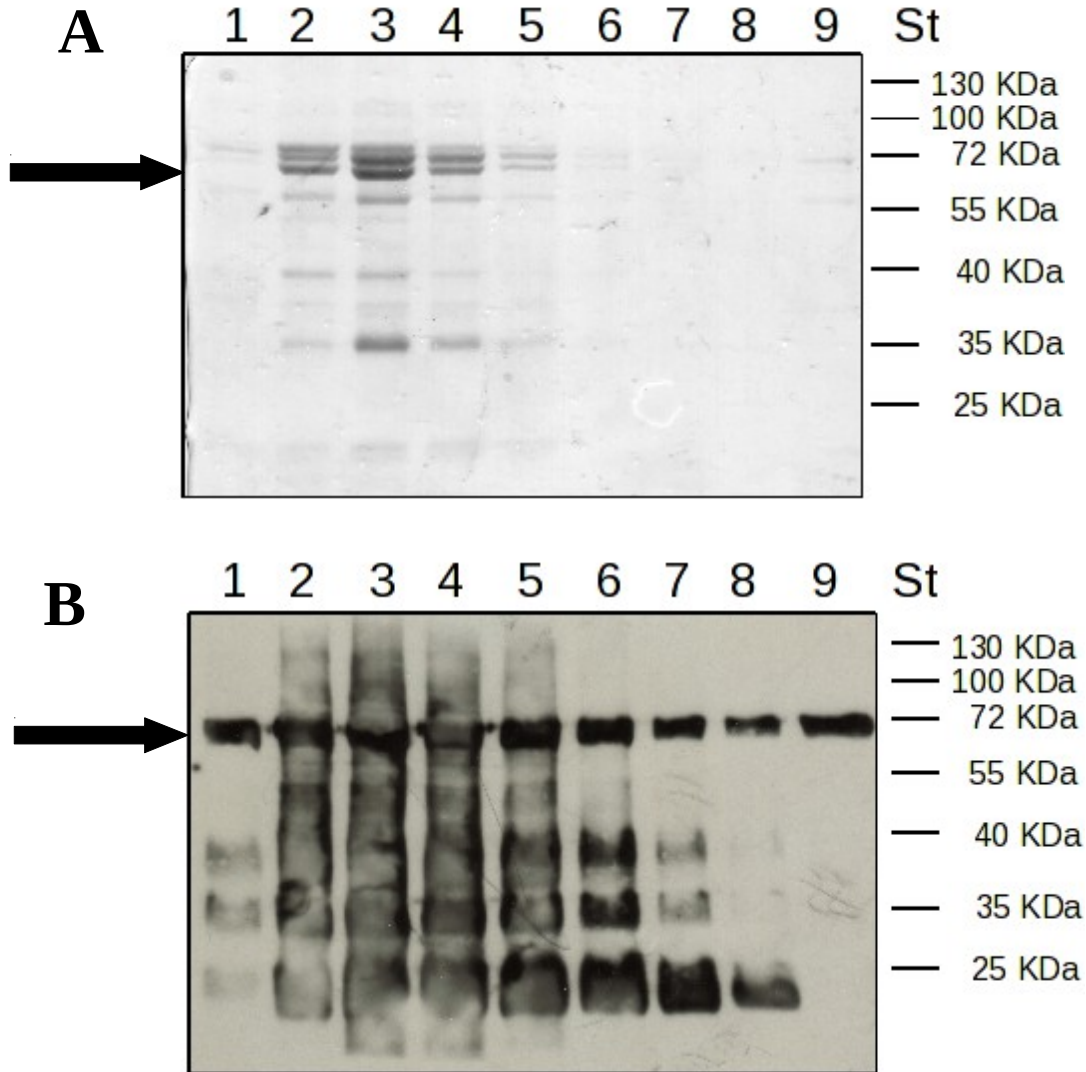


Figura 12. Análisis de las fracciones eluidas desde la cromatografía IMAC de xRIC-8. **A)** muestra el análisis SDS-PAGE de las fracciones eluidas, teñidas con azul de coomassie. **B)** es el análisis “western blot” de las mismas fracciones analizadas en el panel A. La flecha indica la posición de xRIC-8. Los números del 1 al 9 indican las fracciones eluidas. St, son los estándares de masa molecular.

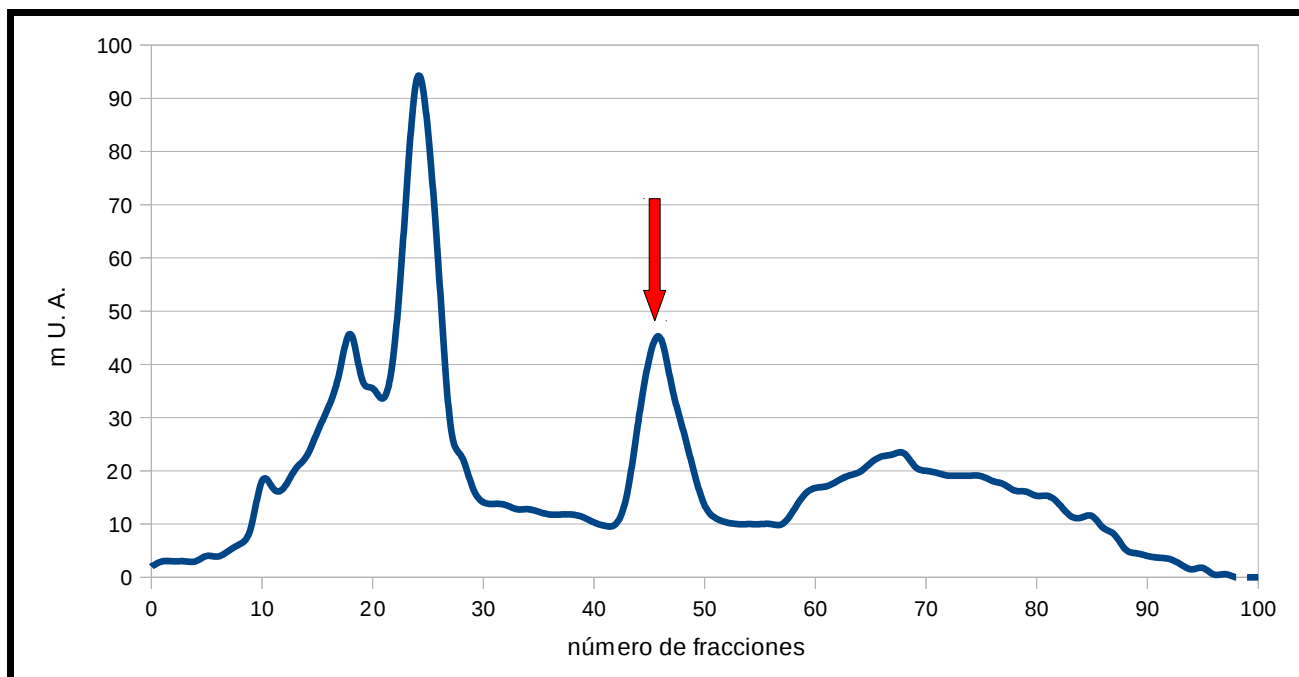


Figura 13. Cromatograma de la elusión de xRIC-8 desde columna HiLoadQ. La cromatografía se realizó a flujo constante de 1 mL/min en un gradiente lineal de NaCl desde 250 mM a 500 mM en 100 min, utilizando un detector UV a una longitud de onda de 280 nm. Se colectaron 100 fracciones de 1 mL. La flecha roja indica el “peak” correspondiente a xRIC-8.

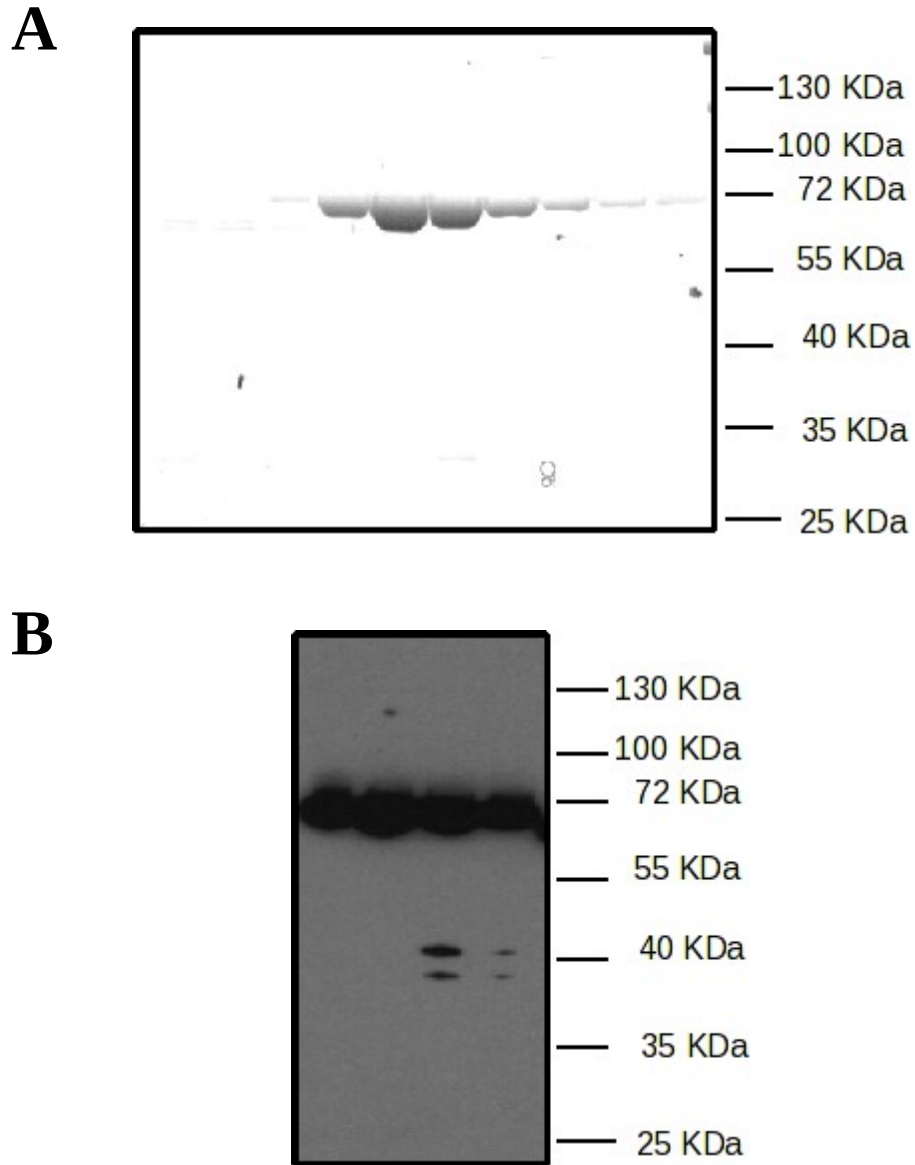


Figura 14. Análisis SDS-PAGE y “western blot” de las fracciones eluidas desde la columna HiLoad Q. A) muestra un gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie, en el cual se han analizado las fracciones pertenecientes al pick de xRIC-8, mostrado en la Figura 12. **B)** es un análisis de “western blot” de las fracciones enriquecidas en xRIC-8 según panel A.

3.- Caracterización estructural de xRIC-8 mediante dicroísmo circular

xRIC-8 expresada y purificada desde bacterias *E. coli* BL21(DE3) fue caracterizada mediante dicroísmo circular para demostrar el alto contenido helicoidal predicho para ella, tanto por los análisis de predicción de estructura secundaria como por el proceso de modelaje por la técnica de “threading”. La caracterización mediante esta técnica experimental fue importante por dos motivos: 1) Es la primera evidencia estructural obtenida experimentalmente para una proteína de la familia RIC-8; y 2) permite apoyar el modelo 3D propuesto para la proteína xRIC-8

Como muestra la **Figura 15**, el espectro de dicroísmo circular obtenido para xRIC-8 corresponde a una curva típica para una proteína alfa helicoidal, mostrando los 2 mínimos característicos a las longitudes de onda de 208 y 222 nm. La cuantificación del contenido alfa helicoidal de xRIC-8, por deconvolución del espectro de dicroísmo circular, nos entregó un valor aproximado del 80%. Este resultado sustenta nuestra predicción de estructura secundaria del tipo alfa helicoidal, y que se convirtió en la primera data estructural para una proteína RIC-8.

Utilizando la técnica de dicroísmo circular, se estudió la estabilidad térmica de xRIC-8, debido a que existe una relación entre número de dominios armadillo presentes en una proteína, y su termo estabilidad. En el experimento, se registró la elipticidad presentada por xRIC-8 a la longitud de onda del mínimo de 222 nm en un rango de temperatura entre 20 y 70 °C (**Figura 15B**). La curva de estabilidad térmica obtenida es típica de una proteína con dos estados estructurales (plegado y desplegado) con una temperatura de transición entre estos estados $T_m = 43,1 \pm 0,1$ °C y una $\Delta H_{VH} = 392,6$ Kcal/mol. El replegamiento de la proteína fue tan sólo de un 47%, al enfriar de los 70 a 20 °C. De manera interesante, el valor de T_m reportado en esta tesis para xRIC-8 es similar al reportado en literatura para α -importina, la cual es de 43 °C (Parmeggiani y col, 2008), recalcando que esta proteína presenta 10 dominios armadillos, al igual que el modelo propuesto para xRIC-8. Estos resultados entregaron un soporte experimental al

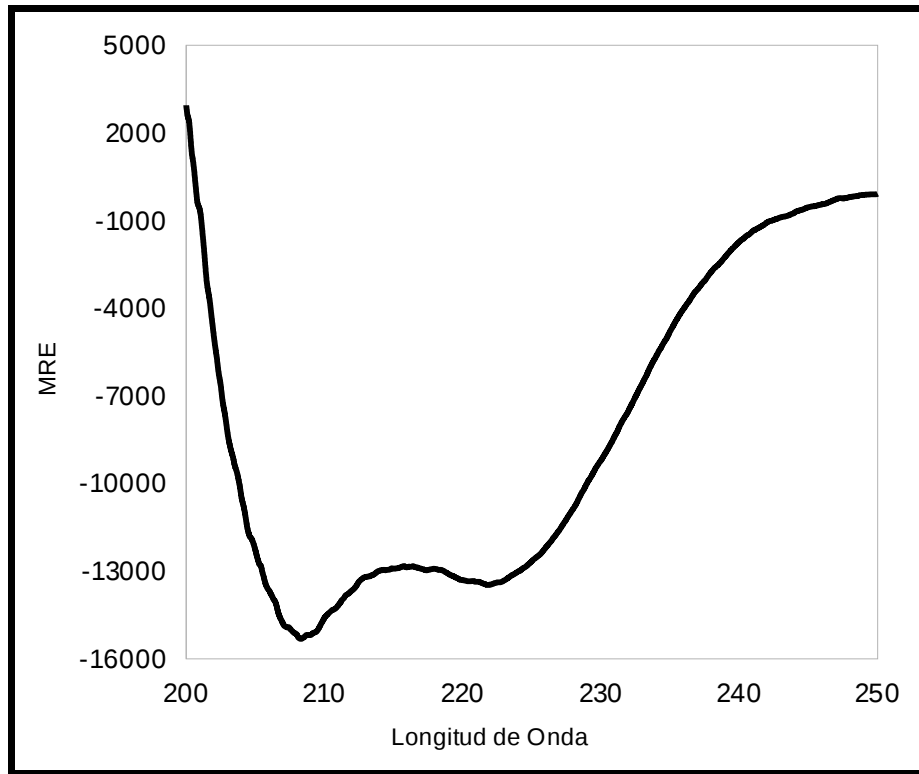
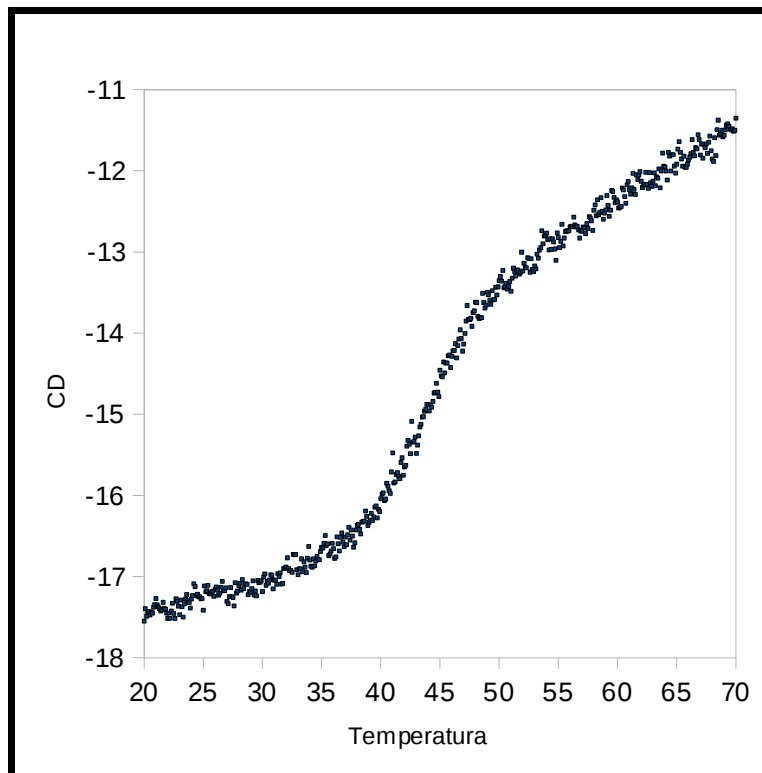
A**B**

Figura 15. Espectro de dicroísmo circular y curva de denaturación térmica de xRIC-8. El panel A muestra el espectro de DC de xRIC-8, con 2 mínimos pronunciados a longitudes de onda de 208 y 222 nm. El panel B, muestra la curva de denaturación, siguiendo la θ a λ 222 nm.

modelo 3D propuesto.

4.- Diseño de mutantes de delección de xRIC-8

La evidencia obtenida del análisis de la estructura primaria de la proteína xRIC-8 indicó que las proteínas RIC-8 presentan una mayor similitud entre sí hacia la región carboxilo. Esto haría presumir que esta región conservada es la que alberga la actividad GEF en esta familia de proteínas, por lo cual se decidió generar mutantes de delección para estudiar la actividad GEF, pues de ser esta premisa cierta, al deleccionar esta región conservada, se elimina también la actividad que radicaría en ellas. Estas mutantes de delección pretenden entonces abolir la actividad GEF de la proteína xRIC-8. Las mutantes de delección fueron diseñadas a partir del modelo 3D, de modo tal que el sitio de corte fuera un “loop”, y por ende no afectara de modo alguno la estructura secundaria de la proteína. Se deleccionó la hélice terminal del último dominio armadillo (ΔH); el armadillo 10 ($\Delta 10$); los armadillos 10 y 9 ($\Delta 10-9$); y por último, una mutante de delección que abarca los armadillos 10, 9 y 8 ($\Delta 10-9-8$). De este modo, se eliminaron 4 de las 6 marcas características de las proteínas RIC-8 (**Figura 16**), reportadas por el servidor PRINTS. Estas mutantes de delección fueron obtenidas por la técnica de PCR y subclonadas en los vectores pQE80l y pCS2+6myc, con el objetivo de estudiar sus propiedades *in vitro* (pQE80L) e *in vivo* (pCS2+6myc).

La **Figura 17** muestra el producto de PCR para las deleciones. Estos productos de PCR fueron subclonados en el vector de pasaje TOPO, y desde este fueron obtenidos por digestión con las enzimas BamHI y KpnI, para ser ligado en el vector pQE80L entre los sitios restricción antes señalados, o con las enzimas XhoI y KpnI para ser subclonados en el vector pCS2+6myc. Esta digestión con dos enzimas distintas, garantiza direccionalidad en el subclonamiento en cada uno de los casos.

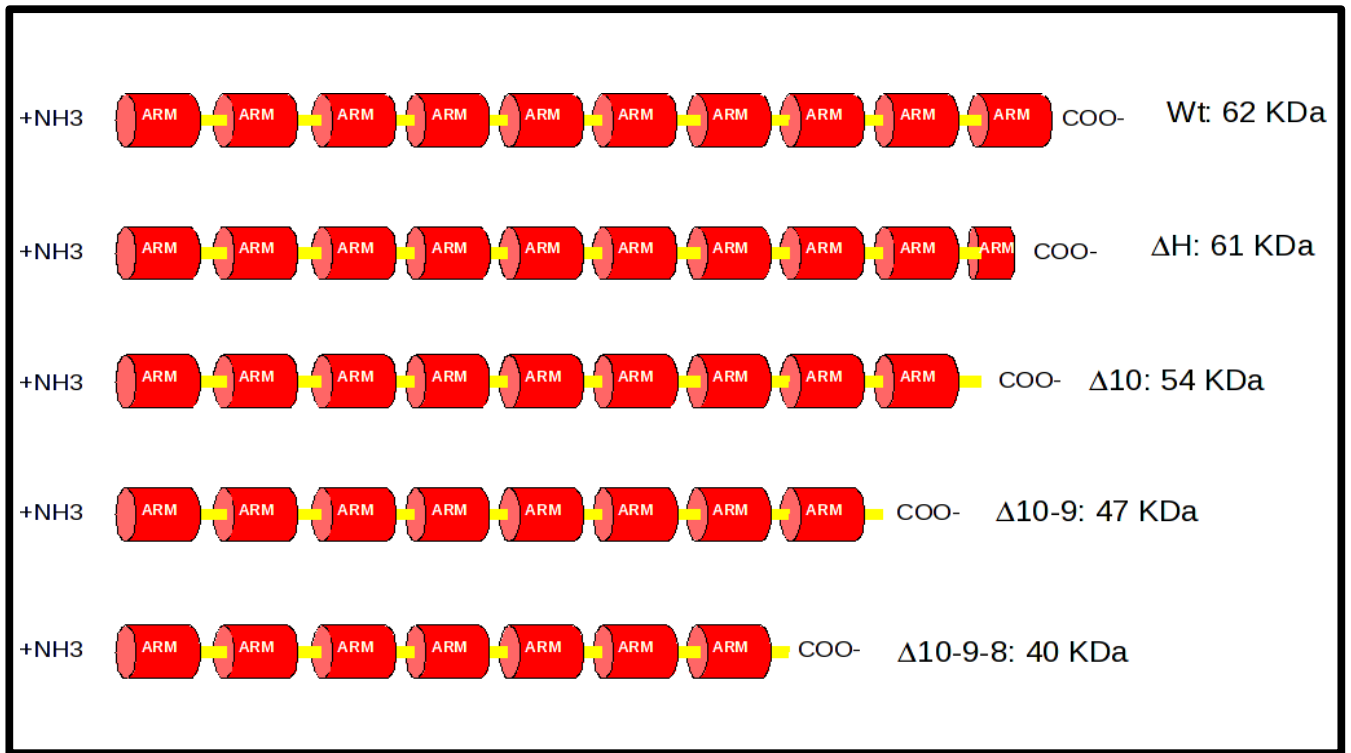


Figura 16. Representación esquemática de los dominios armadillo en xRIC-8 para el diseño de mutantes de delección. Cada dominio armadillo es representado por un cilindro rojo. Se lista cada una de las mutantes de delección, indicando las masas moleculares calculados para cada una de ellas.

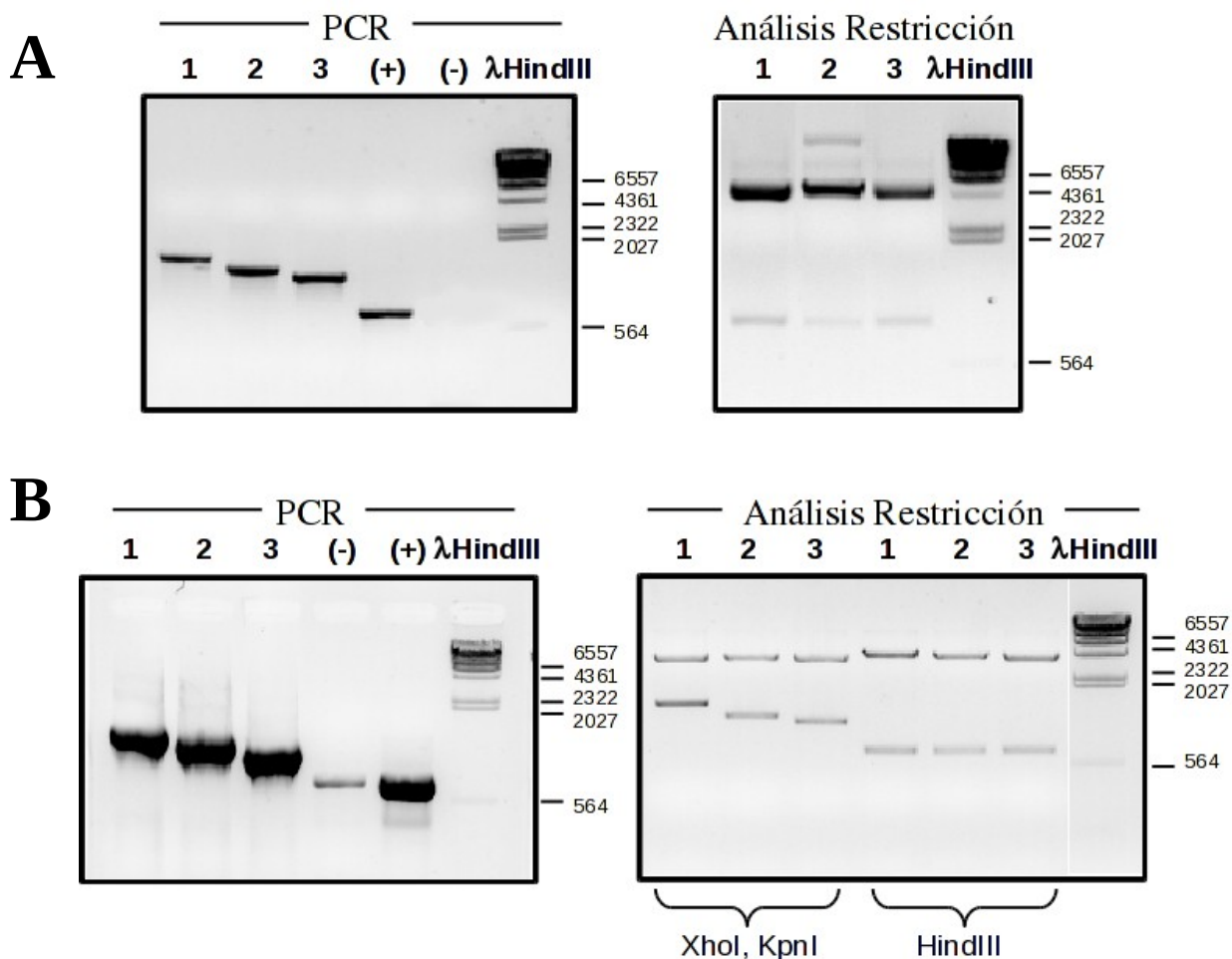


Figura 17. Subclonamiento de las mutantes de delección. A) Amplificación mediante PCR de las mutantes de delección ΔH (1), $\Delta 10$ (2) y $\Delta 10-9$ (3). Las mutantes de delección fueron subclonadas en el vector pQE80L, y mediante digestión con la enzima HindIII, la cual digiere el ADN una única vez en el vector y otra en la región 5' de las mutantes, se verificó el correcto subclonamiento al visualizar liberación de un fragmento de ADN de aproximadamente 1000 pb. B) Amplificación mediante PCR de las mutantes de delección $\Delta 10$ (1), $\Delta 10-9$ (2) y $\Delta 10-9-8$ (3). Las mutantes de delección fueron subclonadas en el vector pCS2+6myc, y se verificó el correcto subclonamiento digiriendo las construcciones con XhoI y KpnI, para liberar completamente el fragmento de PCR subclonado, y mediante digestión con HindIII, la cual digiere en el vector y en la región 5' de las mutantes, liberando un fragmento aproximado de 700 pb. (-): control positivo, (+): control positivo, λ HindIII: marcador de tamaño de ADN en pares de bases (pb).

5.- Expresión y purificación de las mutantes de delección de xRIC-8

Estas mutante de delección fueron expresadas en *E. coli* BL21(DE3), utilizando el mismo protocolo usado para xRIC-8. No obstante, al realizar la purificación, solo se purificó aquella mutante en la cual delecionamos la última hélice del dominio armadillo 10 (ΔH). La **Figura 18** muestra un gel SDS-PAGE donde se analizan las fracciones eluidas desde la cromatografía IMAC para las tres mutantes de delección. Como se aprecia, a medida que acortamos xRIC-8, esta presentó un mayor número de productos de degradación, denotado tanto por los análisis de SDS-PAGE y “western blot”, donde se observó una banda correspondiente al tamaño esperado, y productos de proteólisis, que aumentan en relación con la proteína completa. Esto imposibilitó la purificación de las mutantes de delección ΔH -10 y ΔH -10-9, pues al realizar una posterior cromatografía de intercambio iónico para intentar separar la proteína completa de los productos de degradación, así como de otras proteínas co-purificadas en la cromatografía IMAC, ésta no fue detectable por “western blot” en un ninguna de las fracciones eluidas. Utilizando el mismo protocolo empleado para purificar xRIC-8, la mutante de delección ΔH fue expresada y purificada.

6.- Caracterización estructural de las mutantes de delección mediante dicroísmo circular

La mutante de delección ΔH fue caracterizada por dicroísmo circular, registrando el espectro comprendido entre las longitudes de onda 200 y 250 nm, el cual mostró ser similar al de la proteína completa (**Figura 19**), con los característicos mínimos en 208 y 222 nm, y cuya deconvolución mostró igual porcentaje de estructura secundaria (80% aproximado). Al realizar un estudio de termo-estabilidad, registrando la elipticidad a 222 nm, en el rango de temperatura entre 20 y 70 °C, la mutante de delección ΔH mostró una temperatura de transición de solo 1 grado de diferencia con respecto a xRIC-8, siendo la $T_m = 44,3 \pm 0.1$ °C (**Figura 19**).

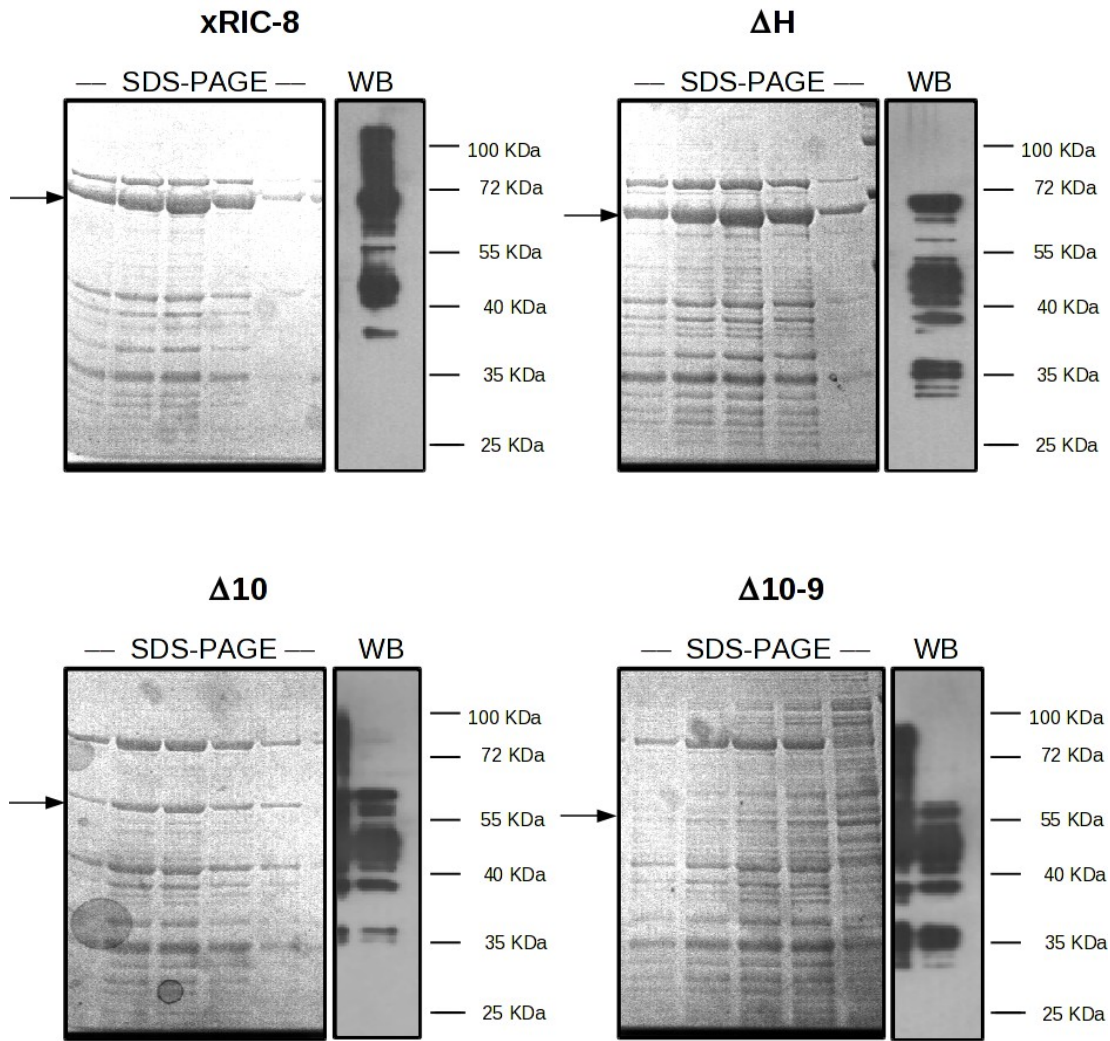


Figura 18. Análisis de fracciones eluidas desde cromatografía IMAC para xRIC-8 y mutantes de delección. Las mutantes fueron expresadas con un protocolo similar al usado para xRIC-8. En cada panel se analizan 5 fracciones eluidas desde columna Ni-NTA a través de geles SDS-PAGE teñidos con azul de coomassie. El panel “WB” corresponde al análisis de “western blot” de una de las fracciones enriquecidas. La flecha indica la posición esperada de la proteína en estudio. Se aprecia que a mayor delección, menor cantidad de proteína soluble y disminución de proteína completa en relación con productos de degradación al eluir la columna Ni-NTA.

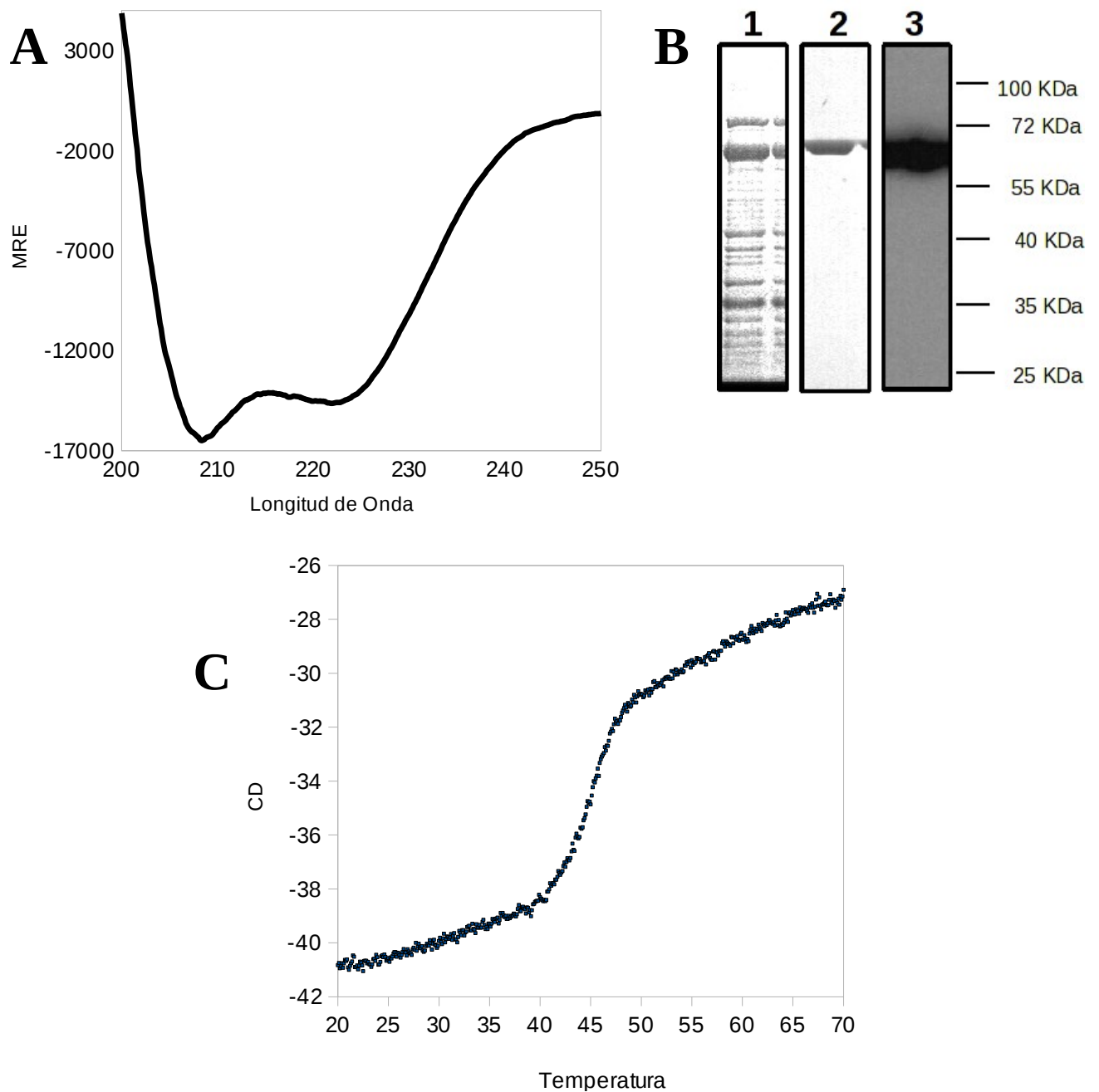


Figura 19. Espectro de dicroísmo circular y curva de termo estabilidad de mutante de delección ΔH . A) muestra el espectro de dicroísmo circular, el cual es similar al de xRIC-8 completa. La calidad de la proteína usada se visualiza en B), un análisis mediante SDS-PAGE y “western blot” de la proteína purificada (1: SDS-PAGE de la cromatografía IMAC; 2: SDS-PAGE de la proteína purificada luego de la cromatografía de intercambio iónico; 3: “western blot” de la fracción analizada en la línea 2. C) muestra la curva de termoestabilidad, siguiendo la θ a 222 nm, en el rango de temperatura expuesto en el gráfico.

V.3.- Análisis de la actividad GEF de xRIC-8 y de diferentes regiones de la proteína

1.- Análisis de actividad GEF *in vitro* por fluorescencia de triptófanos

Dado que $G\alpha_s$ posee un cambio conformacional entre el estado inactivo ($G\alpha_s$ -GDP) y activo ($G\alpha_s$ -GTP), es posible determinar dicho cambio conformacional por fluorescencia de sus triptófanos (Higashijima y col, 1987). $G\alpha_s$ humana fue subclonada con anterioridad en el vector de expresión procarionte pQE80L. Utilizando el protocolo descrito en la sección de “Metodología”, el cual consistió en expresar $G\alpha_s$ en bacterias *E. coli* BL21(DE3) y luego a través de 2 cromatografías, una de afinidad IMAC y otra de intercambio iónico, se logró purificar $G\alpha_s$. La **Figura 20** muestra el análisis de SDS-PAGE y “western blot” de las fracciones obtenidas desde las cromatografía IMAC e intercambio iónico, con las cuales se pudo purificar $G\alpha_s$ (43 KDa) de sus productos de degradación así como también de otras proteínas que copurificaban con ella en la cromatografía IMAC.

Para determinar la influencia de xRIC-8 sobre el intercambio de nucleótidos en $G\alpha_s$, ambas proteínas purificadas fueron incubadas en presencia de GTP- γ -S y se siguió la fluorescencia de los triptófanos excitando a λ^{exc} 290 nm y siguiendo la emisión a λ^{emi} 340 nm. La **Figura 21A** muestra tres curvas de emisión de fluorescencia de los triptófanos en función del tiempo, donde se aprecia que a una mayor concentración de xRIC-8, aumenta también la fluorescencia de los triptófanos, indicando entonces que ha ocurrido de manera efectiva el cambio conformacional en $G\alpha_s$, inducido por su intercambio de GDP a GTP- γ -S, y que este efecto es concentración dependiente de xRIC-8. Este resultado muestra que la proteína xRIC-8 purificada es funcional desde el punto de vista de su actividad GEF.

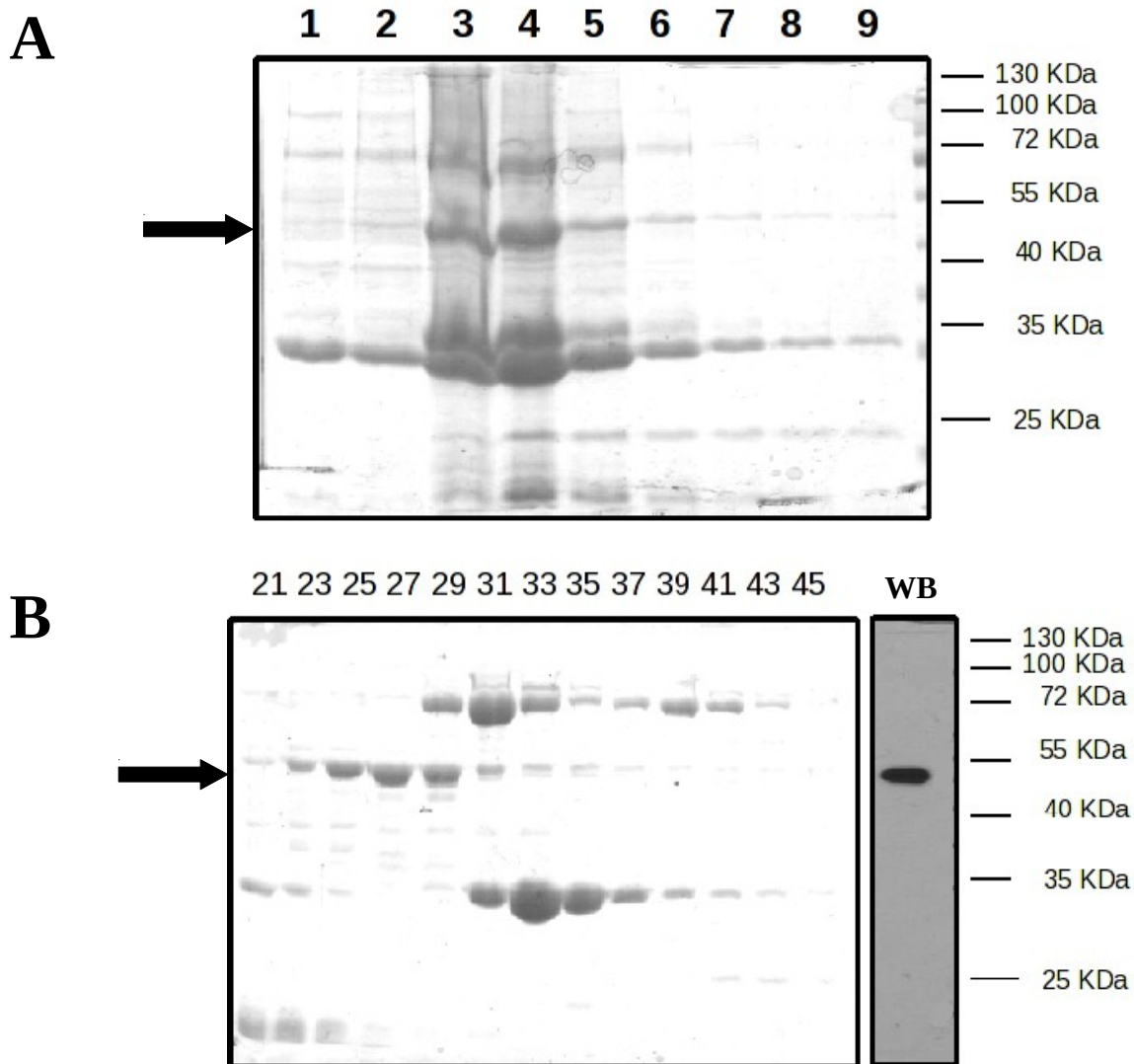


Figura 20. Análisis SDS-PAGE de la purificación de $G\alpha_s$. $G\alpha_s$ fue purificada en dos procesos cromatográficos: IMAC e intercambio iónico con columna HiLoad Q. **A)** es un gel SDS-PAGE teñido con azul de coomassie que muestra 9 fracciones eluidas desde la columna Ni-NTA. **B)** muestra el análisis SDS-PAGE entre las fracciones 21 y 45 de la cromatografía de intercambio aniónico. WB muestra el análisis de “western blot” para $G\alpha_s$ obtenida desde la fracción 27, indicando un alto grado de pureza con respecto a productos de degradación. Flecha indica posición de $G\alpha_s$ en los geles.

2.- Análisis de Actividad GEF *in vitro* por fluorescencia de GTP- γ -S-BODIPY®

Una segunda aproximación experimental para determinar la influencia de xRIC-8 sobre el intercambio de nucleótidos en G α s fue medir el intercambio de GDP por el análogo fluorescente GTP- γ -S-BODIPY®. Este análogo posee conjugado el fluoróforo BODIPY®, el cual al estar unido a la proteína G α s, tiene la capacidad de ser excitado en el visible a λ^{exc} 485 nm y emitir a λ^{emi} 520 nm. De este modo, si el intercambio de nucleótidos es efectivo, se denotará por un aumento en la emisión de fluorescencia a λ^{emi} 520.

G α s fue incubada con GTP- γ -S-BODIPY®, y se comparó la emisión de fluorescencia entregada por el intercambio basal de nucleótidos que presenta G α s, con la emisión de fluorescencia producida en presencia de xRIC-8. La **Figura 21B** muestra la comparación de ambas condiciones señaladas y se observa que en presencia de xRIC-8, aumenta el intercambio de nucleótidos, indicando que xRIC-8 actúa como GEF. Esta aproximación experimental corrobora nuevamente que las proteínas purificadas son funcionales y, para el caso de xRIC-8, nos indica que el espectro de dicroísmo circular obtenido corresponde a la proteína plegada de manera funcional.

3.- Análisis de la actividad GEF *in vivo* por la activación de un gen reportero sensible a AMPc

La incapacidad de purificar las mutantes de delección para estudiar en ellas la actividad GEF *in vitro* derivó en una aproximación más fisiológica, que es estudiar la misma actividad en el contexto celular. Con esta aproximación experimental se adicionó la mutante de delección Δ 10-9-8; por lo tanto, las mutantes de delección estudiadas corresponden a Δ 10, Δ 10-9 y Δ 10-9-8, las cuales eliminan los dominios armadillos 10; 10 y 9; y 10, 9 y 8, respectivamente.

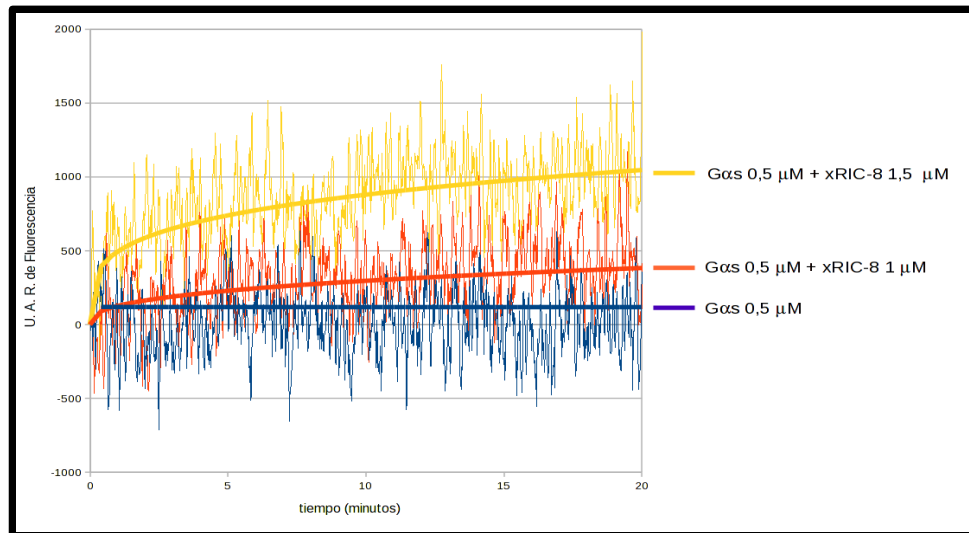
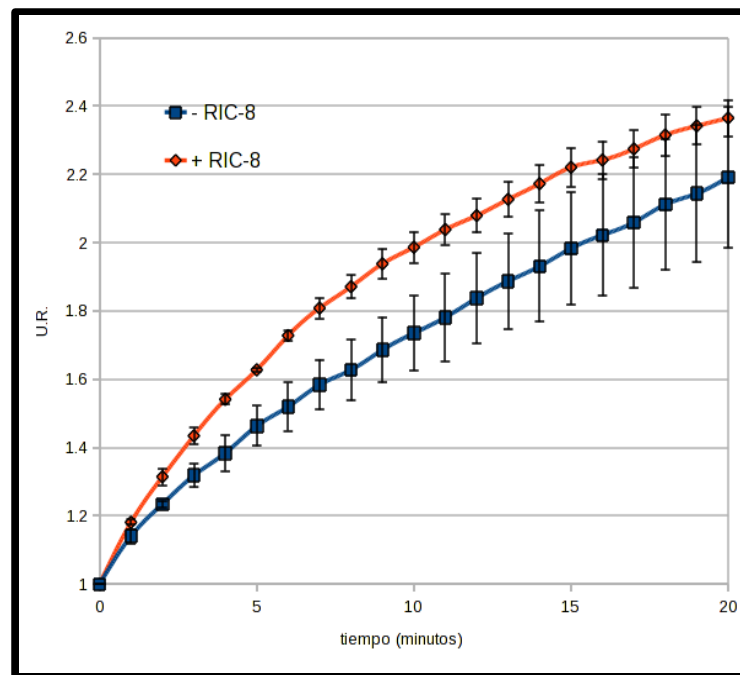
A**B**

Figura 21. Medición de la actividad GEF *in vitro* de xRIC-8 sobre Gαs mediante técnicas de fluorescencia. A) Muestra la actividad GEF siguiendo el cambio conformacional que sufre Gαs al pasar al estado activo, el cual es posible de visualizar mediante la fluorescencia de sus triptófanos excitando a λ^{exc} 290 nm y registrando la emisión a λ^{emi} 340 nm. **B)** Muestra el intercambio de nucleótidos a través de la fluorescencia del nucleótido GTP conjugado con el fluoróforo BODIPY®, excitando a λ^{exc} 485 nm y registrando la emisión a λ^{emi} 520 nm.

Con estas construcciones, además de los plásmidos que codifican para luciferasa y renilla, se transfectaron de manera transiente células HEK293T para estudiar la actividad GEF *in vivo*, a través del análisis de un gen reportero, luciferasa, sensible a AMPc. Las células fueron incubadas en presencia del ligando isoproterenol para activar al GPCR β -adrenérgico, el cuál está acoplado a la proteína G α s, con lo cual estimulamos a la enzima adenilciclase y, por ende, aumentamos los niveles de AMPc intracelular. Esto hace que se active la vía de transducción de señales dependiente de AMPc. El plásmido co-transfectado que codifica para luciferasa posee en su promotor elementos *cis* CRE, que son sensibles a esta vía. Por lo tanto, a mayor cantidad de AMPc, mayor cantidad de luciferasa transcrita y, en consecuencia, mayor enzima luciferasa traducida en el citoplasma. El ensayo consistió entonces en medir la actividad enzimática de luciferasa, y así, a mayor luminiscencia producida, extrapolaremos a una mayor actividad GEF que se manifestó como un aumento en los niveles intracelulares de AMPc.

Bajo esta aproximación, medimos la actividad GEF indirectamente de las distintas mutantes de delección y xRIC-8, observando que todas ellas presentan dicha actividad (**Figura 22**). Este resultado estaría demostrando que la actividad GEF no radicaría en la porción más conservada entre las proteínas RIC-8, que es la región carboxilo, sino que estaría hacia la región amino, región involucrada en la interacción con las proteínas G (Nishimura y col, 2006).

Una observación interesante al realizar este experimento, es que aquellas condiciones de estudio en las cuales se activó la vía de transducción de señales con el ligando isoproterenol, la inmuno señal detectada por “western blot” para xRIC-8 o de las mutantes de delección fue mayor que de aquellas que no fueron estimuladas con isoproterenol (**Figura 22b**).

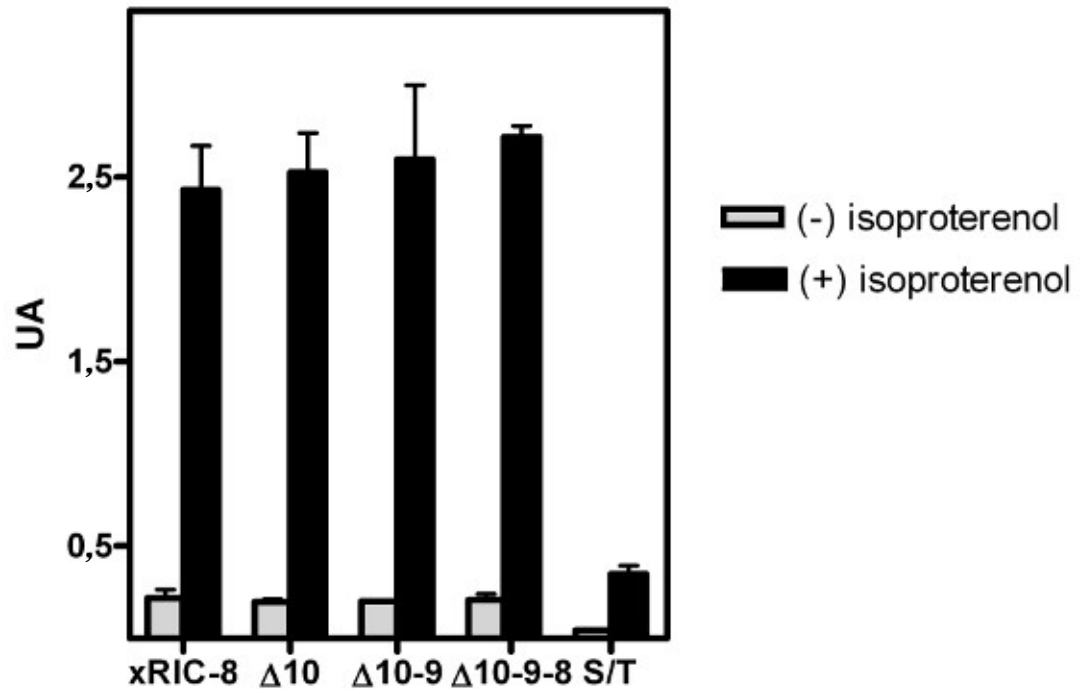
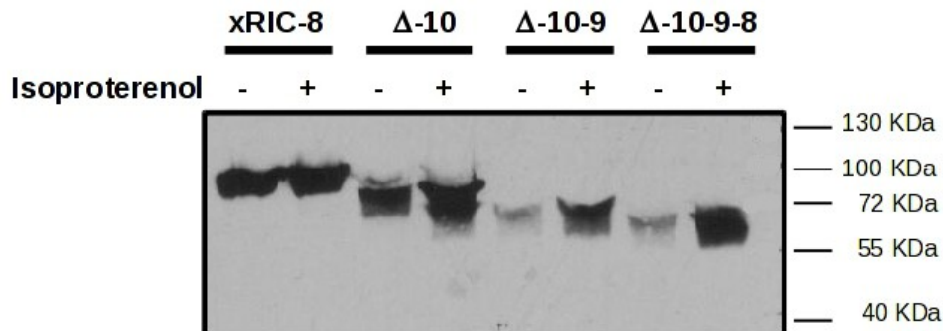
A**B**

Figura 22. Medición de actividad GEF a través de gen reportero luciferasa. Células HEK293T fueron transfectadas con xRIC-8 o las mutantes de deleción, además del gen reportero luciferasa pCreLuc. **A)** Muestra el gráfico de actividad de luminiscencia de luciferasa comparando estos niveles entre xRIC-8 y las mutantes de deleción, no observándose pérdida de actividad GEF. **B)** Es el control de expresión de las proteínas, mediante “western blot” usando el epitope myc que les adiciona el vector a cada una de las proteínas.

4.- Análisis de la actividad GEF *in vivo* por el aumento de la concentración intracelular de AMPc

Para verificar los resultados de actividad GEF indirecta por medición del gen reportero luciferasa, se diseñó un nuevo experimento para demostrar la actividad GEF de una manera más directa, sin necesidad de tener que depender de la vía de transducción de señales completa. La aproximación consistió en la medición directa de la concentración de AMPc intracelular. De este modo, se hicieron mediciones a corto plazo, del orden de los minutos, posterior a la estimulación con isoproterenol, tiempos acordes con los eventos no-genómicos característicos de una activación de un GPCR hasta la generación del 2do mensajero.

Células HEK293T fueron transfectadas con los plásmidos que codifican xRIC-8 o las mutantes de delección, y fueron estimuladas con isoproterenol por 15 minutos. Posterior a eso, las células fueron lisadas y se midió la cantidad de AMPc intracelular como se describe en “Materiales y Métodos”. Para una correcta medición, se creó una curva estándar de AMPc, y sobre ella se interpoló la concentración de AMPc presente en las células HEK293T. Como se observa en la **Figura 23**, las tres mutante de delección mantienen su actividad GEF, mostrando niveles de AMPc sobre el basal superiores a las células sin transfectar. Al igual que la medición realizada de manera indirecta de la concentración de AMPc, a través del gen reportero luciferasa, se confirma que la actividad GEF no radica en la región carboxilo, sino que se localiza hacia la región amino.

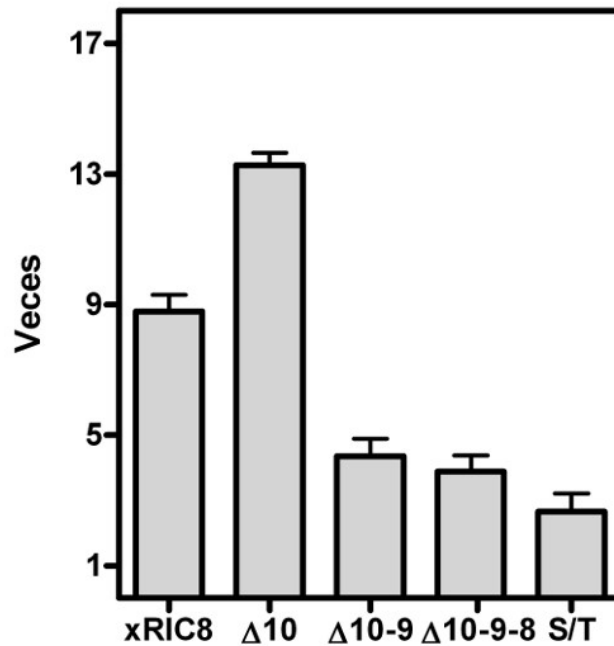
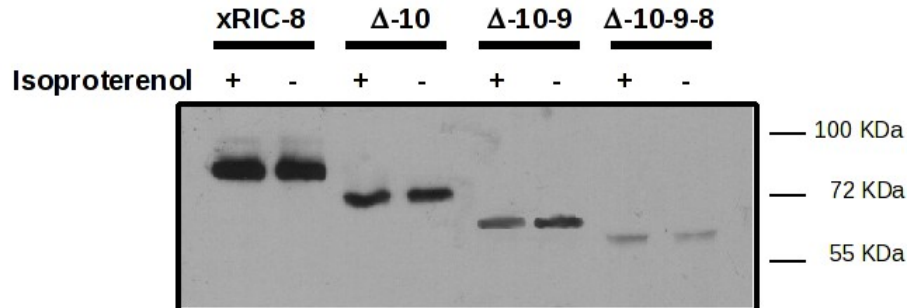
A**B**

Figura 23. Medición indirecta de actividad GEF mediante cuantificación de AMPc intracelular. Células HEK293T fueron transfectadas con xRIC-8 o mutantes de delección, y se cuantificó la cantidad de AMPc intracelular post estimulación con Isoproterenol. **A)** muestra el gráfico donde se compara la razón de niveles de AMPc (+ isoproterenol/- isoproterenol) de las distintas proteínas en estudio. Se puede apreciar que todas las proteínas elevan los niveles de AMPc por sobre la condición sin transfectar (S/T), lo que implica que conservan su actividad GEF. **B)** es el control de expresión de la proteínas mediante la técnica de “western blot” usando el epítotope myc que les adiciona el vector pCS2+6myc a cada proteína.

5.- Estudio de translocación de xRIC-8 y mutantes de delección a la membrana plasmática

Para que xRIC-8 estimule a través de su actividad GEF sobre G α s, debe poder migrar desde el citoplasma hasta la membrana plasmática (Klattenhoff y col, 2003). Se evaluó de manera complementaria a los experimentos de actividad GEF *in vivo*, la capacidad de translocar a la membrana plasmática de xRIC-8 y mutantes de delección al ser estimuladas las células con isoproterenol, y observación mediante microscopía confocal, a modo de verificar si la delección de los armadillos de la porción carboxilo de xRIC-8 posee alguna función relacionada con el mecanismo de translocación.

Células HEK293T fueron transfectadas con los plásmidos que codifican para xRIC-8 o las mutantes de delección, y fueron estimuladas con isoproterenol. Las células fueron fijadas a distintos tiempos post estimulación, y se realizó una inmuno citoquímica para visualizar la proteína xRIC-8 o las mutantes de delección.

Los resultados mostraron que xRIC-8 transloca a la membrana plasmática presentando un “pick” a 2 horas post estimulación con isoproterenol. Este “pick” indica que a este tiempo, la mayoría de las células muestran a xRIC-8 en la membrana plasmática. Al comparar este resultado con lo observado para las mutantes de delección, vemos que estas últimas poseen un comportamiento idéntico al de xRIC-8, translocando a la membrana y presentando el mismo pick de 2 horas (**Figura 24**).

Para demostrar que esta translocación es debida a la interacción de xRIC-8 y/o mutantes de delección con G α s, se diseñó un experimento de co-inmuno precipitación. Para este experimento, se transfectaron células HEK293T con xRIC-8 o sus mutantes de delección co-transfectadas con G α s, luego de lo cual se inmunoprecipitó xRIC o las mutantes de delección, y se realizó “western blot” contra G α s. La **Figura 25** muestra el resultado de la co-

inmunoprecipitación, donde se observa que tanto xRIC-8 como las mutantes de delección interaccionan con G α s.

Este experimento, junto con los de medición de actividad GEF *in vivo*, indican que las mutantes de delección se comportan exactamente igual que la proteína nativa, y que por ende, la ausencia de la región carboxilo, comprendida entre los dominios armadillo 8 y 10, no tiene participación alguna en lo que es actividad GEF o regulación de algún tipo sobre ella, además de no alterar su migración a la membrana plasmática. Esto claramente indica que la actividad GEF de la proteína xRIC-8 se encuentra en la región amino terminal, aquella que es más variable entre las proteínas RIC-8, y que, en consecuencia, la región de estructura primaria conservada en la familia RIC-8 no es la que alberga dicha actividad, común a todas las proteínas RIC-8.

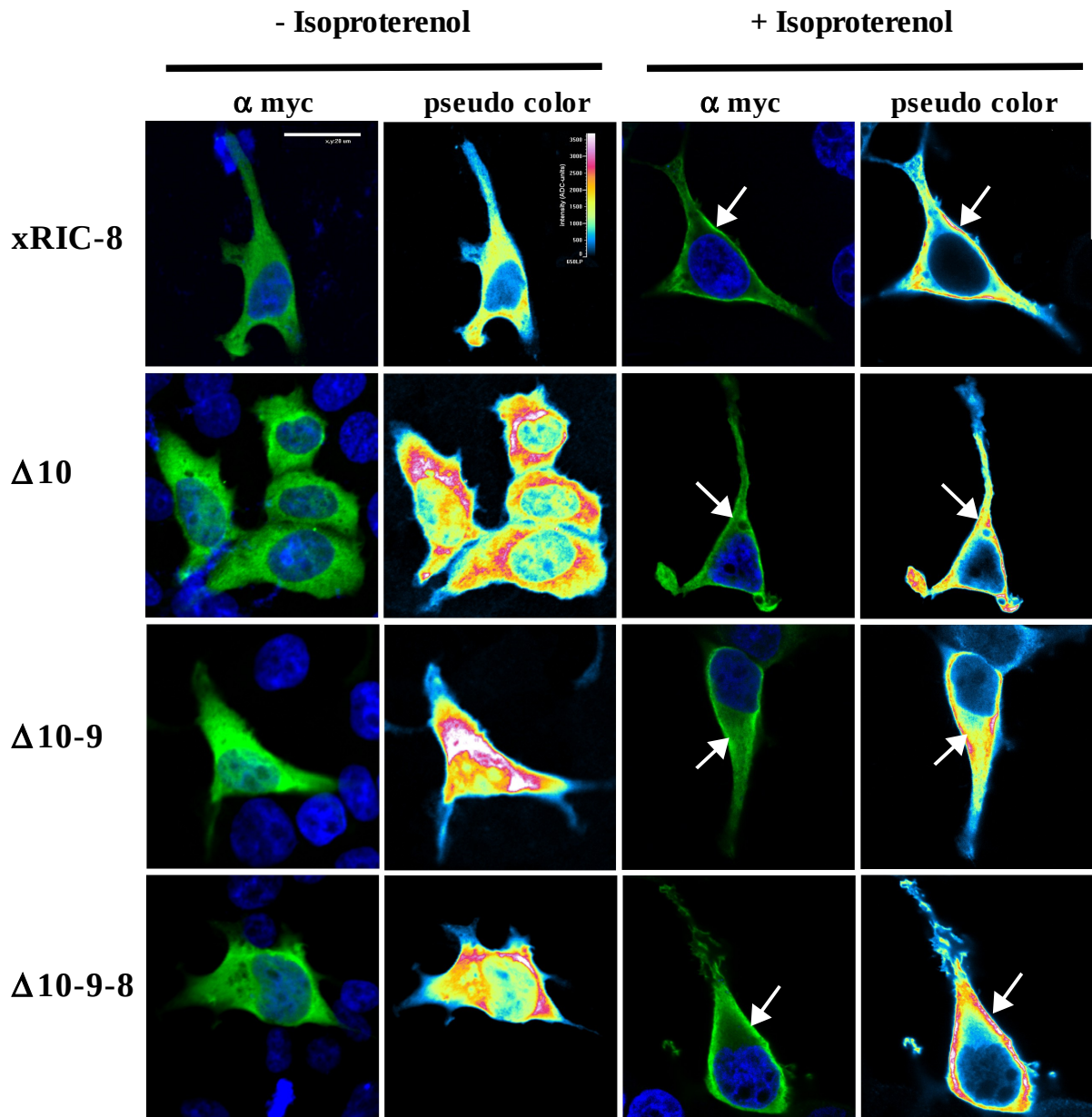


Figura 24. Estudio de translocación de xRIC-8 y mutantes de delección a membrana plasmática inducido por isoproterenol. A través de microscopía confocal, se determinó la translocación a membrana plasmática de cada una de las proteínas en estudio. La inmunocitoquímica se realizó con un anticuerpo anti myc, acoplado a fluoróforo que emite en el verde. El pseudo color, hace referencia a la intensidad de color verde observada en cada panel, y entrega una cualificación mayor sobre la intensidad de señal. Los núcleos han sido teñidos con TOPRO. Se aprecia que en todas las condiciones en las cuales se estimuló con isoproterenol, las proteínas migraron a la membrana (flecha blanca). Los células estimuladas con isoproterenol fueron procesadas 2 horas post incubación.

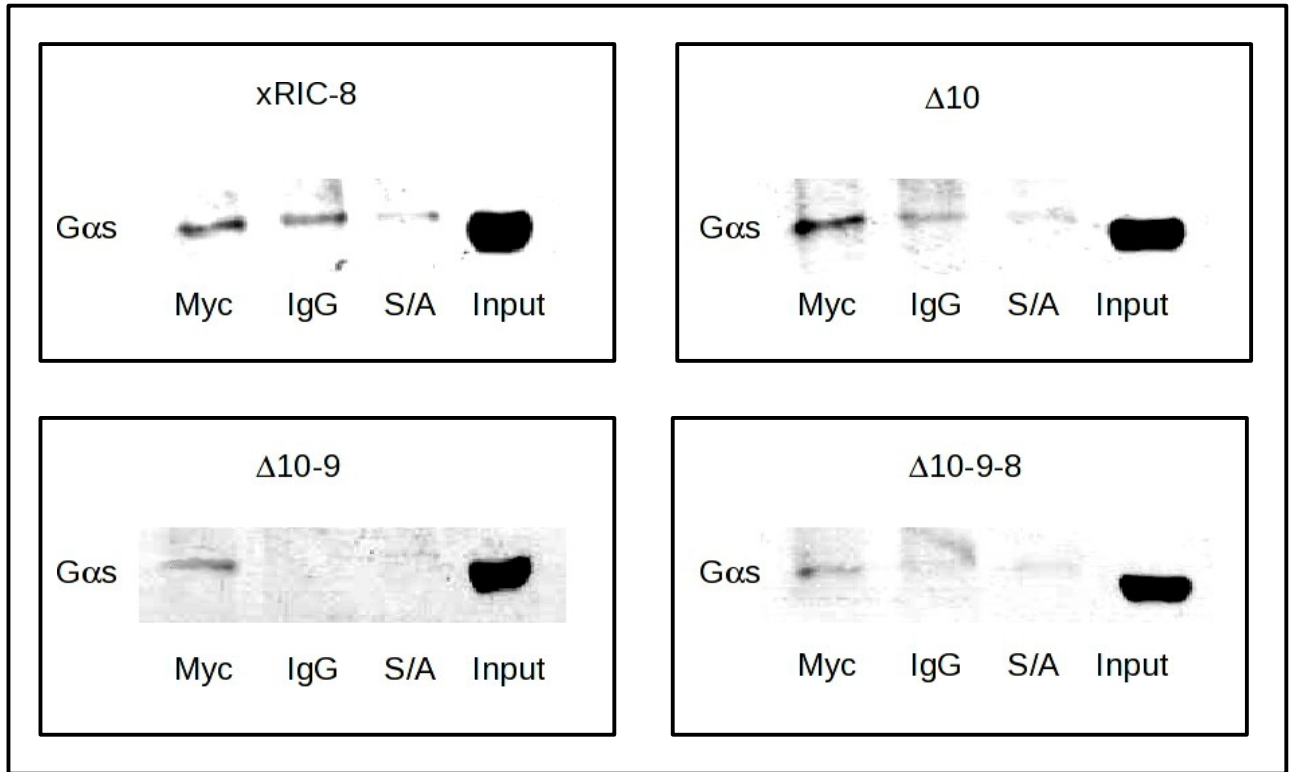


Figura 25. Co-inmuno precipitación de xRIC-8 o mutantes de delección con $G\alpha_s$. Células HEK293T fueron transfectadas con xRIC-8 o las mutantes de delección, así como también con $G\alpha_s$. Las proteínas fueron inmunoprecipitadas usando un anticuerpo anti myc y mediante “western blot” contra $G\alpha_s$ para identificar la interacción de ésta con las mutantes de xRIC-8. Las líneas indicadas con Myc, son inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti myc; IgG es inmunoprecipitación usando una IgG no relacionada; S/A ensayo sin anticuerpo; Input, indica la presencia de $G\alpha_s$ en el lisado celular inicial.

VI. DISCUSIÓN

La función de una proteína está dada por su estructura. Esta afirmación es el dogma de la biología estructural e implica que para poder entender cabalmente la función de una proteína, es necesario conocer su estructura. Al disponer de la estructura para una proteína, es posible estudiar su mecánica de acción a través de herramientas de biología molecular, como mutaciones sitio dirigidas o deleciones, que muestren cómo se altera la función producto de los cambios introducidos.

Un segundo dogma en biología estructural es aquel que indica que la estructura terciaria de la proteína está codificada en su estructura primaria. De este modo, la determinación de la relación entre estructura y función en las proteínas se podría realizar hoy en día, relacionando la estructura primaria de la proteína con las estructuras primarias de otras proteínas de función conocida, siempre y cuando la secuencia aminoacídica de la proteína en estudio cumpla los requisitos mínimos de conservación de identidad con las proteínas con función conocidas. Esta conservación ha sido determinada estadísticamente, lo que ha permitido inferir entonces los porcentajes mínimos de identidad aminoacídica para asumir que dos proteínas podrían ser similares en su estructura y, por ende, similares en su función. De igual modo, al comparar las secuencias aminoacídicas de proteínas con estructura terciaria conocida, se ha podido inferir que 30% es el porcentaje mínimo de identidad para que dos proteínas presenten una estructura similar (Martí-Renom y col, 2000). Sin embargo, secuencias aminoacídicas con una identidad inferior al 30% también pueden presentar estructura terciaria similar, lo cual presenta un tercer dogma en el área de la biología estructural: la estructura es más conservada que la secuencia (Martí-Renom y col, 2000).

Lo señalado anteriormente se ha convertido en una herramienta útil para el estudio de la

relación entre estructura y función de las proteínas, en especial de aquellas para las cuales no se ha logrado determinar su estructura terciaria de manera experimental. Cada día se depositan más proteínas cuya estructura tridimensional se ha resuelto experimentalmente en la base de datos “Protein Data Bank”, lo que hace que aumente la probabilidad de encontrar una proteína con estructura terciaria conocida que presente una identidad de secuencia adecuada (mayor al 30%) con la proteína en estudio, lo que permite entonces utilizar esta proteína como molde de plegamiento para adquirir una estructura similar a la de aquella depositada en “Protein Data Bank”. Esta aproximación es conocida como “Modelaje Comparativo” (Martí-Renom y col, 2000), debido a que se basa en la premisa de que dos proteínas con similar estructura primaria, presentarán igual estructura terciaria.

Basados en esta información, los investigadores han podido caracterizar de manera más profunda las proteínas, determinando características estructurales a nivel de estructura secundaria, al reconocer motivos presentes en las proteínas. Por ejemplo, sitios de modificaciones postraduccionales (fosforilación, glicosilación, etc.) en la estructura primaria de la proteína en estudio. Esta información se encuentra presente en bases de datos especializada (Prosite, pfam) y han permitido la creación de herramientas bioinformáticas capaces de utilizar la secuencia aminoacídica en estudio y explorar las bases de datos en búsquedas de características estructurales de la proteína en estudio. Toda la información recopilada a partir únicamente de la estructura primaria de una proteína es la base para los estudios de estructura función, cuando no se dispone de la estructura terciaria de la proteína en estudio.

Esta tesis se enmarca en esta área, donde se ha intentado determinar primeramente motivos y/o dominios proteicos propios de proteínas con actividad GEF. RIC-8 aparece como una familia de proteínas con características, desde el punto de vista de secuencia aminoacídica, única, sesgando cualquier posibilidad de acierto -en base a comparación de secuencias- en la

predicción de motivos que dé cuenta de características funcionales, como mostraron los análisis mediante BLAST o usando SMART y ScanProsite al buscar motivos y/o dominios. En la literatura se reporta que las proteínas con actividad GEF poseen una gran diversidad de estructuras (Sprang, 2001), presentando proteínas de transmembrana (GPCR) y proteínas citoplasmáticas multidominio, como los GEF para proteínas Rho; algunos de estos dominios con actividad GEF son predecibles por técnicas bioinformáticas, como los dominios DH (Rossman y col, 2005); no obstante, xRIC-8 no presentó ningún dominio de este tipo. Esto hace más interesante y atractivo el problema, pues al ser una familia única de proteínas, sin similitud de secuencia con alguna de estructura conocida y, ante la incapacidad de obtener información haciendo una búsqueda de patrones, dominios y/o motivos en su secuencia, la única manera posible de inferir una relación entre su estructura y su función se reduce a la determinación de la estructura terciaria de xRIC-8 y, con base en ella, inferir dominios o regiones que den cuenta de su actividad.

La estrategia utilizada para la obtención de la estructura terciaria de xRIC-8 es a través de la metodología de reconocimiento de plegamientos o “threading”, su nombre en inglés. Esta técnica se basa en la premisa ya señalada de que la estructura es más conservada que la secuencia. Ante esto, aunque nuestra secuencia no presente una identidad de secuencia con alguna otra proteína de estructura conocida, podría plegarse en alguno de los plegamientos conocidos. El principal argumento para validar esta observación la entrega el análisis de la información presente en “Protein Data Bank”, en asociación con la información presente en la base de datos de plegamiento SCOP (Andreeva y col, 2007). Este análisis indica que en el año 2009 no se publicaron plegamientos nuevos y en el 2008 solo hubo seis nuevos, sumando a la fecha de hoy un total de 1.393. A nivel de superfamilia, tampoco hubo reportes de nuevas en el año 2009 y se suma un total de 2.222. Cabe mencionar que el máximo de plegamientos y

superfamilias nuevas reportadas durante un año fue de 146 y 245 respectivamente, datos correspondientes para el año 2004. Si comparamos los valores de plegamientos con el número total de estructuras de proteínas depositadas en el PDB, podemos observar una gran diferencia, pues solo en los cuatro primeros meses del 2010 se han depositado 2.312 estructuras, con un valor total acumulado 59.977 estructuras de proteínas a la fecha. Claramente la diferencia numérica entre el número de plegamientos (1.393) y estructuras de proteínas depositadas (59.977) es superior a un orden de magnitud, lo que implica que existe una gran redundancia de información en el “Protein Data Bank”; pero lo más importante, es que este estancamiento en la aparición de nuevos plegamientos en los últimos años podría implicar que se estaría cubriendo un porcentaje importante del espacio conformacional que adquieren las proteínas para plegarse y, sin duda, este hecho es el principal argumento hoy en día para validar la técnica de “reconocimiento de plegamiento” o “threading”, pues existe una probabilidad alta de que una proteína de secuencia conocida posea un plegamiento conocido.

El modelo final de xRIC-8 fue obtenido con la herramienta i-Tasser (Zhang, 2008), cuya metodología de “threading” localizado en conjunto con técnicas bioinformáticas *ab initio* para generación de estructuras, han permitido que i-Tasser sea en la actualidad la mejor herramienta automatizada para reconocimiento de plegamiento y generación de un modelo 3D de la proteína en estudio, como lo demuestra el resultado en el último evento CASP (“Critical Assessment of protein Structure Prediction”, <http://www.predictioncenter.org>), competencia para softwares que predicen estructura terciaria de proteínas basados solamente en la secuencia aminoacídica.

El modelo 3D propuesto para xRIC-8 se fundamenta no solo en la data estadística antes expuesta, sino que además cumple con restricciones propias de cualquier estructura terciaria de una proteína, como poseer una baja energía conformacional y no presentar problemas estereoquímicos. Los análisis realizados con ProSA II y con el gráfico de Ramachandran

entregaron los resultados para estas dos cualidades, siendo ambas satisfactorias. ProSA II mostró una sola porción de alta energía, centrada cerca del aminoácido 300. Este error en la estructura se podría deber a la alta presencia de zonas no estructuradas en dicha región. Los “loops” que unen las hélices se hacen más largos y esto explicaría la alta energía en dicha zona. Si se analiza la energía aminoácido por aminoácido, se observa que muchos con alta energía son residuos de prolina, los cuales estéricamente están en conformaciones no aceptables como lo muestra la información entregada por el gráfico de Ramachandran. A su vez, este último gráfico muestra claramente la gran mayoría de los aminoácidos están en conformaciones permitidas, a excepción de algunas prolinas. La orientación de los aminoácidos, desde un punto de vista de distribución en la proteína, también es correcto, manteniendo un elevado porcentaje de aminoácidos polares hacia la superficie de la misma (76%) e interiorizando un alto porcentaje de los aminoácidos apolares (59%). La orientación de las hélices son todas acordes con una proteína armadillo, generando un giro a la derecha y manteniendo la gran mayoría de los residuos de leucina dentro de las mismas. También se presenta la conservación de las leucinas entre H2 y H3 que interactúan entre sí (**Figura 8B**). Las hélices H3 forman una superficie entre ellas, característica de las proteínas armadillo (Andrade y col, 2001), pues se ha observado que es a través de esta superficie donde prevalecen las áreas de interacción con otras proteínas, según observaciones de los mismo autores, y es quizás a esta región de la proteína RIC-8 donde se deberían enfocar estudios futuros.

Desde el punto de vista estructura-función, el modelo propuesto para xRIC-8 es válido igualmente, debido a las características funcionales que presentan la proteína xRIC-8, como es la capacidad de interactuar con un gran número de proteínas, principal característica de las proteínas armadillo, como lo muestran los estudios por doble híbrido realizados en nuestro laboratorio (Lara, 2008) así como por otros autores (Kerr y col, 2008). Las proteínas con las que

interacciona RIC-8 dan cuenta de que esta última podría estar participando en más de un evento celular, como sería el remodelamiento del citoesqueleto (Afshar y col, 2004). Por otra parte, la actividad GEF no es algo nuevo en las proteínas armadillo, pues ya se han reportado casos como en smgGDS y HspBP1 que, si bien esta última no es una proteína de la familia “repeticiones armadillo”, corresponde a un miembro de la superfamilia “repeticiones ARM” según la clasificación de SCOP y, por ende, da cuenta de un ancestro evolutivo directo con actividad GEF.

Para poder apoyar el modelo 3D propuesto para xRIC-8, se realizó una caracterización a través de la técnica de dicroísmo circular; para ello, se logró estandarizar un protocolo de expresión y purificación para xRIC-8. La principal ventaja del modelo escogido de estudio para las proteínas RIC-8, el de *X. laevis*, fue la solubilidad al expresarse en bacterias *E. coli*. Esta solubilidad fue suficiente para que a partir de 4 litros de cultivo se pudiera obtener una cantidad de proteína para realizar los estudios de dicroísmo circular. El rendimiento obtenido, 5 mg totales, son suficiente para realizar otro tipo de estudios estructurales como estudios cristalográficos que permitirán validar el tipo de plegamiento predicho para xRIC-8.

Los estudios de dicroísmo circular y termo estabilidad de xRIC-8 fueron esenciales para demostrar su correcto plegamiento. Estos resultados corresponden a los primeros estudios experimentales que evidencian características estructurales para cualquier proteína de la familia de RIC-8. El espectro de dicroísmo circular fue obtenido entre los 200 y 250 nm, rango de longitudes de onda para la deconvolución y obtención del contenido en porcentaje de estructura secundaria presente en xRIC-8 por parte del software SOMCD (Unneberg y col, 2001). Este estudio reveló que xRIC-8 es una proteína con un alto contenido helicoidal 80% (aproximado según SOMCD), con mínimos a 208 y 222 muy pronunciados, con una forma de espectro muy similar a lo esperado para proteínas armadillo (Parmeggeani y col, 2008) y que se condice muy bien con el modelo propuesto, el cual solo posee estructuras helicoidales.

La curva de denaturación térmica, realizada midiendo la elipticidad a λ 222 nm, permitió determinar que xRIC-8 se comporta como una proteína con dos estados: plegado y desplegado, lo que indica que es una proteína globular, sin dominios estructurales independientes. Si bien xRIC-8 presenta 10 dominios armadillo, estos no son independientes unos de otros, por lo tanto, no son dominios verdaderos; esto explica por qué observamos solo estos dos estados. El resultado experimental de estabilidad térmica también valida el modelo propuesto, tanto por la información de estados de plegamiento, como por el valor de T_m determinado, el cual fue 43.1 °C, valor casi idéntico que el reportado para α -importina (Parmeggiani y col, 2008), que también posee 10 dominios armadillos. La renaturación alcanzada por xRIC-8 discrepa un poco de lo reportado para las proteínas armadillo (Parmeggiani y col, 2008), específicamente para β -catenina, proteína que no presenta renaturación al enfriar, a diferencia de xRIC-8 que presentó un 47% de renaturación. Esto se podría deber a parches hidrofóbicos presentados por β -catenina, lo que haría que β -catenina genere en el desplegamiento agregados hidrofóbicos incapaces de volver al estado inicial de la proteína. Toda esta información en conjunto permite validar de manera experimental nuestra predicción de plegamiento y el modelo 3D propuesto, por lo cual podemos aseverar que las proteínas RIC-8 son un miembro de la familia armadillo.

Los estudios en busca de la región de xRIC-8 que dé cuenta de su actividad GEF, se basaron en los análisis de estructura primaria que muestran que las proteínas RIC-8 son mucho más conservadas entre ellas hacia la región carboxilo terminal, observación que ha permitido determinar, según el servidor PRINTS (Attwood y col, 2003), que las proteínas RIC-8 poseen secuencias conservadas hacia esta región, graficadas en seis motivos características. Basados en el hecho de que todas las proteínas RIC-8 son GEF, se asumió la premisa de que esta conservación en la función se debería manifestar como una conservación en parte de su estructura primaria y de ahí a postular esta región conservada como aquella que alberga la función GEF.

Para intentar demostrar esto, se diseñaron mutantes de delección basadas en el modelo 3D, eliminando sucesivamente dominios armadillos desde la región carboxilo hacia la amino, llegando a eliminar los últimos tres armadillos, de los 10 en total y, con ello, eliminando casi por completo la región conservada en las distintas RIC-8. Para hacer estas delecciones más racionales, fueron diseñadas de tal modo de realizar los cortes en las regiones de unión entre armadillos; de este modo, evitamos romper elementos de estructura secundaria que podrían generar inestabilidad proteica.

Las mutantes de delección diseñadas fueron subclonadas en vectores de expresión procarionte y eucarionte para realizar una caracterización tanto *in vitro* como *in vivo*. No obstante, no fue posible expresar ni purificar estas mutantes de delección desde bacterias *E. coli* BL21(DE3), pues entre más se delecionaba xRIC-8, más inestable era la proteína obtenida, obteniendo una gran cantidad de proteólisis y prácticamente no se observó la proteína completa en las condiciones estudiadas. La incapacidad de expresar y purificar las mutantes de delección en bacterias, se podría deber a problemas en el plegamiento de las mismas o simplemente a que generaran toxicidad bacteriana, por interferir en procesos bioquímico propios de la célula huésped. Sin embargo, la delección ΔH , en la cual solo se delecionó la última hélice del dominio armadillo 10, fue posible de expresar y purificar, y mostró un espectro de dicroísmo circular y una termo estabilidad similar al de la proteína completa. Thomas y colaboradores en 2008 trabajaron con la proteína RIC-8A de rata, la cual debieron delecionar los últimos 38 aminoácidos para poder expresarla en *E. coli* y así purificarla. Solo utilizando células Sf9 lograban obtener la proteína RIC-A de rata nativa completa, pero no en cantidades suficientes para estudios biofísicos (Thomas y col, 2008). En el mismo estudio, muestran que la versión delecionada de RIC-8A de rata posee actividad GEF, por lo cual concluyen que la región de los 38 últimos residuos de esa proteína no participa en su actividad GEF ni en la capacidad de reconocer a las proteínas G.

Debido a esta publicación, es que se obvió el estudio de la mutante de delección ΔH en los estudios *in vivo* presentados en esta tesis y se decidió abarcar una zona más extensa considerando los últimos 186 aminoácidos, correspondientes a los armadillos 8, 9 y 10.

Para estudiar si la actividad GEF radica en la porción carboxilo de xRIC-8, se procedió a realizar estudios *in vitro* de actividad GEF, midiendo el intercambio de nucleótido GDP por GTP en $G\alpha_s$, y estudios *in vivo*, en los cuales se midió el nivel de AMPc intracelular. Sin embargo, ante la incapacidad de purificar las mutantes de delección desde *E. coli*, no fue posible realizar los experimentos de actividad GEF *in vitro* para estas mutantes. De este modo, se utilizó la aproximación de medición de actividad GEF *in vitro* para la proteína completa, técnica que además de corroborar la actividad GEF esperada para xRIC-8, demostró que la proteína purificada era funcional. La metodología *in vitro* utilizada fue fluorescencia intrínseca de triptófanos así como también intercambio de nucleótido marcado con fluoróforo (GTP- γ -S-BODIPY®). xRIC-8 promovió el intercambio de nucleótidos GDP por GTP en la proteína $G\alpha_s$ humana. Desde el punto de vista de la técnica propiamente tal, claramente el uso de nucleótidos marcados fluorescentemente disminuye el ruido de la señal, en comparación a la fluorescencia intrínseca de los triptófanos, no obstante, ambas técnicas resultaron ser un método válido para evaluar la actividad GEF de xRIC-8. $G\alpha_s$ se caracteriza por presentar un intercambio basal alto y esto queda evidenciado en el estudio realizado con el nucleótido marcado fluorescentemente, donde vemos que tanto la curva de intercambio en ausencia como en presencia de xRIC-8 son pronunciadas, mostrando la curva en presencia de xRIC-8 una mayor pendiente en los primeros minutos, que dan cuenta entonces de una influencia positiva en el intercambio de nucleótidos en la proteína $G\alpha_s$. Este alto intercambio basal que presenta $G\alpha_s$ haría presumir que no necesita de proteínas GEF distintas a los GPCR, como lo sugiere recientemente la literatura (Nagai y col, 2010); sin embargo, nuestro grupo ha demostrado en trabajos previos (Romo y col, 2008) que

xRIC-8 sí actúa como proteína GEF sobre $G\alpha_s$, lo cual ha sido verificado nuevamente en esta tesis por estas técnicas basadas en fluorescencia.

Los estudios de actividad GEF *in vivo*, utilizando dos aproximaciones -medición de AMPc intracelular a través de un gen reportero sensible a AMPc y medición directa de los niveles de AMPc intracelular- mostraron que las mutantes de delección conservaron la actividad GEF. En el experimento de medición de AMPc intracelular a través de un gen reportero sensible a AMPc (**Figura 22A**) se muestra que las mutantes de delección son capaces de generar niveles de AMPc intracelulares suficientes para desencadenar la transcripción de un gen. Al contrastar estos resultados con los presentados para la medición directa de los niveles de AMPc intracelular (**Figura 23A**), se observa que aparentemente las mutantes de delección $\Delta 10-9$ y $\Delta 10-9-8$ han perdido su actividad GEF, situación que se contrapondría con los resultados de la **Figura 22A**, sin embargo, la tendencia de ellos es levemente superior que el nivel basal y significativamente mayor si normalizamos los valores por la cantidad de proteína sobre expresada. Claramente a medida que aumenta el número de repeticiones armadillo delecionadas, disminuye la inmuno señal dada por el “western blot” (**Figura 23A**), por lo que si se realiza una densitometría de la inmuno señal y se usa esta información para normalizar los resultados, se observa que todas las mutantes de delección presentan una diferencia significativa con respecto al basal. De manera interesante, las mutantes de delección aumentaron su inmuno señal cuando las células fueron incubadas en presencia del ligando isoproterenol (**Figura 22A**, comparar señal en presencia y ausencia de isoproterenol). Este ligando activa la vía dependiente de AMPc al estimular al receptor β -adrenérgico, GPCR acoplado a proteína $G\alpha_s$, por lo que es posible especular que cuando RIC-8 está de alguna forma activa, es decir, funcionando como GEF en un contexto celular, se estabiliza y aumenta su vida media intracelular. Si bien esto no es claro para la proteína completa, las mutantes de delección sí muestran este comportamiento. La explicación

podría radicar en que estas mutantes de delección podrían estar exponiendo secuencias PEST y, de este modo, debido a un cambio conformacional con respecto a la proteína nativa, acortando la vida media de la proteína, situación que no sucedería al estar interaccionando con otra proteína, que en este caso sería G α s. Dichas secuencias PEST se presentarían en xRIC-8, mostrando siete posibles secuencias tipo PEST, cinco de ellas entre los aminoácidos 1 y 400, como lo demuestra un análisis de la secuencia de xRIC-8 en el servidor “ePestFind” (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>). Estudios recientes (Nagai y col, 2010), indican que RIC-8B de rata estaría estabilizando a G α s en la membrana plasmática y a través de este mecanismo permite que G α s active a la adenilil ciclasa. Esta estabilización podría ser mutua y, de este modo, G α s permitiría ocultar las secuencias PEST que podrían estar exponiendo las mutantes de delección para xRIC-8 y así aumentar la vida media de estas proteínas.

La teoría de la estabilización mutua tiene sustento no solo en el reporte citado y en la observación realizada por “western blot”, sino que también en estudios de translocación de xRIC-8 a la membrana plasmática inducido por isoproterenol. Estos estudios demuestran que tanto las mutantes de delección como la proteína completa migran hacia la membrana plasmática, ubicándose en el mismo microdominio celular que G α s y, de este modo, explican y sustentan los resultados de actividad GEF *in vivo*. Tan importante como estos datos funcionales es el tiempo que demora en evidenciarse el máximo de xRIC-8 en la membrana plasmática, que es de 2 horas, un tiempo demasiado largo para un evento no genómico. Este tiempo es concordante con la idea de que de alguna manera se está estabilizando en la membrana, lo más probable por su interacción con G α s. El por qué de este largo tiempo no es claro, pues las mediciones de AMPc directo son realizadas tan solo 15 minutos post estimulación con isoproterenol, y a este tiempo ya se observan niveles elevados de AMPc, lo que indicaría que sí hay un efecto GEF de xRIC-8

sobre G α s. El mecanismo por el cual este proceso de ubicación en la membrana plasmática tampoco parece ser simple difusión proteica, debido a este tiempo de 2 horas. Estudios de doble híbrido realizados en nuestro laboratorio indican que xRIC-8 interacciona con proteínas pertenecientes a vesículas del Golgi, como son δ -Cop (Lara, 2008). Por otra parte, G α s podría ubicarse en la membrana plasmática gracias a su paso a través de Golgi, lugar donde es modificada postraduccionalmente con palmitato. Nuestro laboratorio hipotetiza que es en este proceso donde podría RIC-8 o sus mutantes de delección estar interaccionando con G α s, y así siendo llevada a la membrana plasmática (Pastén, 2010), lo que indicaría que la translocación de RIC-8 depende del recambio de G α s en la membrana plasmática; como lo demuestran los autores (Nagai y col, 2010), RIC-8 estabiliza a G α s en la membrana evitando su recambio vía degradación, con lo cual generamos una acumulación de G α s. A su vez, esto generaría una acumulación de RIC-8, lo que podría explicar el tiempo de 2 horas.

Un modelo que explica lo sucedido (**Figura 26**), en ausencia de un estímulo, xRIC-8 estaría libre en el citoplasma y G α s estaría en la membrana formando parte del heterotrímero inactivo G $\alpha\beta\gamma$. G α s en este contexto es degradada vía proteosoma y nuevas G α s son llevadas a la membrana (Nagai y col, 2010). Al estimular un GPCR acoplado a la proteína G α s, esta última se logra separar del heterodímero G $\beta\gamma$ y está disponible para que xRIC-8 realice su actividad GEF. Esto permite que G α s se estabilice y ya no sea degradada vía proteosoma, lo que genera una acumulación de proteína G α s en la membrana plasmática. La palmitoilación que posee G α s es del tipo reversible, por lo que al perderla, debe viajar hasta el Golgi para ser nuevamente modificada lipídicamente; de igual modo, en ningún momento se ha detenido la síntesis *di novo* de G α s. Esto permitiría que xRIC-8 interaccione a nivel de Golgi con G α s y esto llevaría a aumentar progresivamente la concentración de xRIC-8 en la membrana plasmática, teniendo un

pick a las 2 horas post estimulación del GPCR. La misma mecánica ocurre para las mutantes de delección, con la excepción que de alguna manera, esta interacción con G α s permite un aumento en la concentración intra celular total de las mutantes de delección.

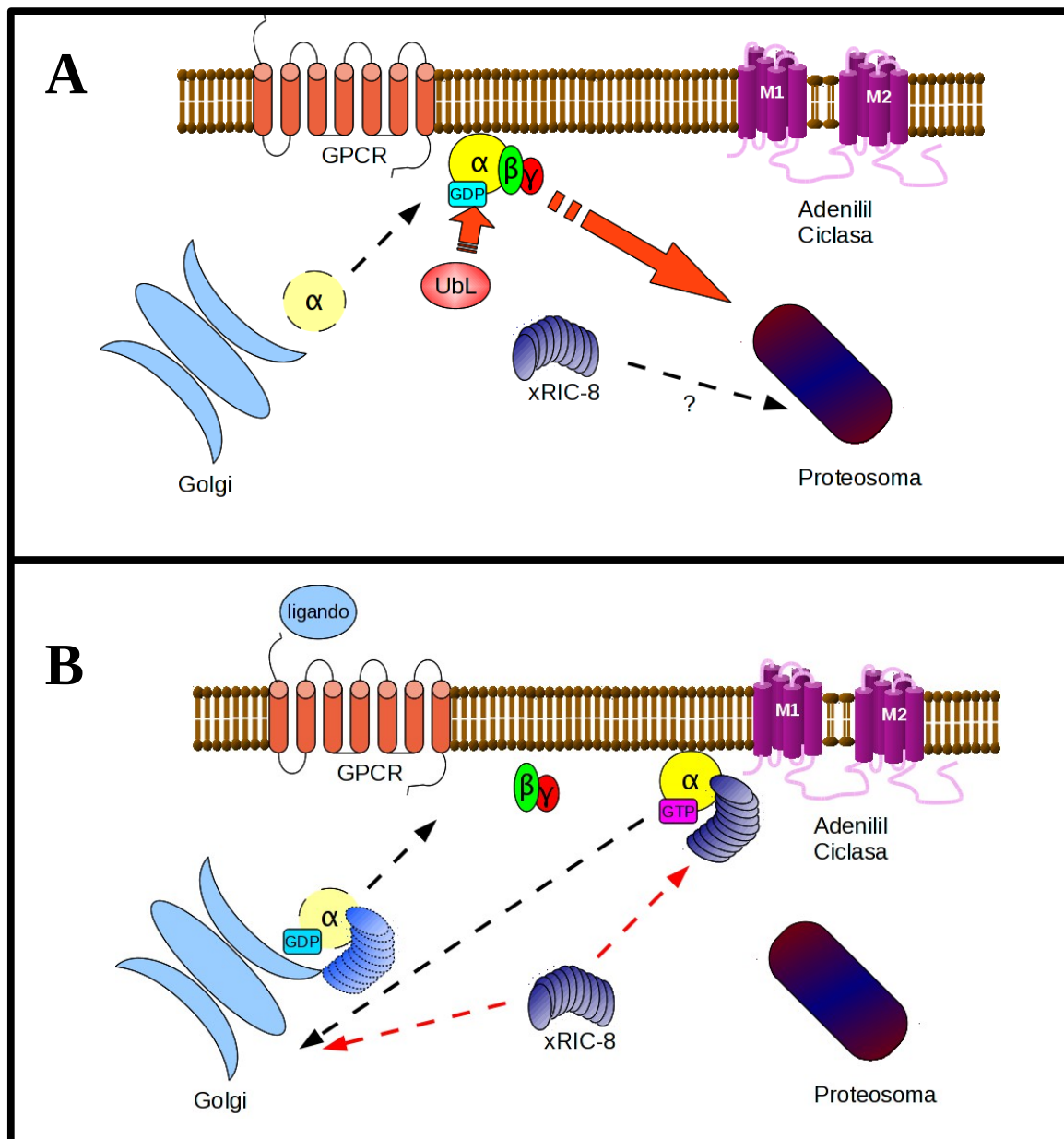


Figura 26. Esquema de acción de xRIC-8 *in vivo*. A) En ausencia de ligando, $G\alpha_s$ está formando parte del heterotrímero $G\alpha\beta\gamma$, y está susceptible a ser ubiquitinada y degradada vía proteosoma. xRIC-8 está en el citoplasma y podría ser degradada vía proteosoma. B) En presencia de un ligando que active un GPCR acoplado a $G\alpha_s$, hará que ésta se separe del heterodímero $G\beta\gamma$. En esta condición, xRIC-8 puede migrar a la membrana para estabilizar a $G\alpha_s$, impidiendo su ubiquitinación. Esta migración podría ser por simple difusión o en conjunto con $G\alpha_s$ a través del paso de esta última por el Golgi. Esta asociación permitiría una estabilidad mutua entre $G\alpha_s$ y xRIC-8.

Recapitulando, se ha logrado clasificar a las proteínas RIC-8 dentro de las que poseen un plegamiento alfa-alfa superhélice, de la familia “repeticiones ARM” y en la superfamilia “repeticiones armadillo”. Con base en esta información se generó el primer modelo 3D para una proteína de la familia RIC-8, en este caso para RIC-8 de *X. laevis*, el cual cuenta con 10 repeticiones armadillo y que, mediante experimentos de dicroísmo circular así como también de termo estabilidad, se ha podido apoyar el modelo estructuralmente propuesto. Apoya también el modelo la data publicada que muestra que RIC-8 posee la capacidad de interactuar con varias proteínas, característica esencial de las proteínas armadillo. Con este modelo se diseñaron mutantes de delección que dieran cuenta de la pérdida de actividad GEF, eliminando parte de la región más conservada de las proteínas RIC-8 (región carboxilo); no obstante, los estudios de actividad GEF *in vivo* mostraron que esta región no era la responsable de dicha actividad y que, por lo tanto, la actividad GEF radica en alguna porción de la región amino terminal. Esta porción conservada podría, sin embargo, estar participando de alguna manera en el control de la vida media de las proteínas RIC-8.

Desde le punto de vista de dilucidar la región, y más puntualmente los aminoácidos importantes para la actividad GEF, deberán realizarse estudios posteriores, tomando en cuenta para ello la región amino terminal y, en especial, los aminoácidos de las hélices H3, pues por lo general es en esta superficie con la cual interactúan las proteínas armadillo.

VII. CONCLUSIONES

De los estudios descritos en esta tesis se infieren las siguientes conclusiones:

1. RIC-8 ha sido clasificado como una proteína “alfa-alfa superhélice”, de la familia “repeticiones ARM” y en la superfamilia “repeticiones armadillo”
2. Se propuso el primer modelo 3D para una proteína RIC-8
3. La región carboxilo terminal, la más conservada entre RIC-8, no alberga la actividad GEF
4. Deleciones de la región más conservada de RIC-8 no alteran su función GEF ni su comportamiento en células HEK293T al ser estimuladas con isoproterenol

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Afshar K, FS Willard, K Colombo, CA Johnston, CR McCudden, DP Siderovski, P Gonczy (2004) "RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos" *Cell*. 119(2):219-30
- Afshar K, Willard FS, Colombo K, Siderovski DP, Gonczy P (2005) "Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division" *Development*. 132(20):4449-59
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) "Basic local alignment search tool" *J Mol Biol*. 215(3):403-10
- Andrade MA, C Petosa, SI O'Donoghue, CW Müller, P Bork (2001) "Comparison of ARM and HEAT Proteins Repeats" *J Mol Biol* 309:1-18
- Attwood TK, P Bradley, DR Flower, A Gaulton, N Maudling, AL Mitchell, G Moulton, A Nordle, K Paine, P Taylor, A Uddin, C Zygouri (2003) "PRINTS and its automatic supplement, prePRINTS" *Nucleic Acids Res*. 31(1):400-402
- Bagowski C. J. Myers, J. Ferrel (2001) "The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocyte" *JBC*, 276 (40): 37708-37714
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA. (2001)"Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 10037-10041
- Bayaa M. R. Booth, Y. Sheng, X. Liu (2000) "The classical progesterone receptor mediates *Xenopus* oocyte maturation through a nongenomic mechanism" *PNAS*, 97 (23): 12607-12612
- Canutescu, A.A., Shelenkov, A.A., and Dunbrack, R.L. (2003). "A graph theory algorithm for protein side-chain prediction". *Protein Sci*. 12: 2001-2014
- Couwenbergs C, A Spilker, M Gotta (2004) "Control of Embryonic Spindle Positioning and Galfa Activity by *C. elegans* RIC-8" *Current Biology* 14:1871-1876
- Cherfils J, P Chardin (1999) "GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins" *Trends Biochem Sci*. 24(8):306-311
- Cherfils J (2001) "Structural mimicry of DH domains by Arfaptin suggests a model for the recognition of Rac-GDP by its guanine nucleotide exchange factors" *FEBS Lett*. 507(3):280-484
- Coates, J.C. (2003). "Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom". *TRENDS*

- DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://pymol.sourceforge.net>
- Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G, Baker NA (2007) "PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations." *Nucleic Acids Res.* 35(Web Server issue):W522-5
- Erickson JW, RA Cerione (2004) "Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes" *Biochemistry.* 43(4):837-42
- Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. (2006) "Comparative protein structure modeling using Modeller" *Curr Protoc Bioinformatics.* Chapter 5:Unit 5.6
- Geiser AH, MK Sievert, LW Guo, JE Grant, MP Krebs, D Fotiadis, A Engel, AE Ruoho (2006) "Bacteriorhodopsin chimeras containing the third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin activate transducin for GTP/GDP exchange" *Protein Sci.* 15(7):1679-1690
- Gilman AG (1987) "G proteins: transducers of receptor-generated signals" *Annu Rev Biochem.* 56:615-649.
- Ginalski, K., Elofsson, A., Fischer, D., and Rychlewski, L. (2003). "3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions" *Bioinformatics* **19**:1015-1018
- Hess HA, JC Roper, SW Grill, MR Koelle (2004) "RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetrically regulate mitotic spindle positioning in *C. elegans*" *Cell.* 119(2):209-218
- Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) "GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation". *J.Chem.Theory Comput.* **4**: 435-447
- Johnston CA, Siderovski DP. (2007) "Structural basis for nucleotide exchange on G alpha i subunits and receptor coupling specificity" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(6):2001-6.
- Karnoub AE, DK Worthylake, KL Rossman, WM Pruitt, SL Campbell, J Sondek, CJ Der (2001) "Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors" *Nat Struct Biol.* 8(12):1037-41
- Kerr DS, Von Dannecker LE, Davalos M, Michaloski JS, Malnic B. (2008). "Ric-8B interacts with G alpha olf and G gamma 13 and co-localizes with G alpha olf, G beta 1 and G gamma 13 in the cilia of olfactory sensory neurons" *Mol Cell Neurosci* **38**(3):341-348.

- Kirchoff, W. 1993. EXAM: A two-state thermodynamic analysis program, Gaithersburg, Maryland.
- Klattenhoff C, M Montecino, X Soto, L Guzmán, X Romo, MA García, B Mellstrom, JR Naranjo, MV Hinrichs, J Olate (2003) “Human Brain Synembryn Interacts With Gsalfa and Gqalfa and is Translocated to the Plasma Membrane in Response to Isoproterenol and Carbacol” *J Cell Physiol* 195:151-157
- Lara P. (2008) “Identificación de proteínas que interaccionan con Ric-8 de *Xenopus laevis*” Tesis para optar al Título profesional de Bioquímico
- Letunic I, R Copley, B Pils, S Pinkert, J Schultz, P Bork (2006) “SMART 5: domains in the context of genomes and networks” *Nucleic Acids Res* 34: D257-D260
- Liu, S., Zhang, C., Liang, S., and Zhou, Y. (2007). “Fold recognition by concurrent use of solvent accessibility and residue depth” *Proteins* **68**: 636-645
- Lovell SC, Davis IW, Arendall WB 3rd, de Bakker PI, Word JM, Prisant MG, Richardson JS, Richardson DC. (2003) “Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation” *Proteins* 50(3):437-50.
- Martí-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sánchez R, Melo F, Sali A. (2000) “Comparative protein structure modeling of genes and genomes” *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:291-325.
- McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000) “The PSIPRED protein structure prediction server”. *Bioinformatics* **16**: 404-405
- Miller K, M Emerson, J McManus, J Rand (2000) “RIC-8 (Synembryn): a Novel Conserved Protein that is Required for Gqalfa Signaling in the *C. elegans* Nervous System” *Neuron.* 27:289-299
- Miller K, J Rand (2000) “A Role for RIC-8 (synembryn) and GOA-1 (Goalfa) in Regulating a Subset of Centrosome Movements During Early Embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*” *Genetics* 156:1649-1660
- Mori K, M Hata, S Neya, T Hoshino (2005) “Common semiopen conformations of Mg²⁺-free Ras, Rho, Rab, Arf, and Ran proteins combined with GDP and their similarity with GEF-bound forms” *J Am Chem Soc.* 127(43):15127-15137
- Mossessova E, RA Corpina, J Goldberg (2003) “Crystal structure of ARF1*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism” *Mol Cell.* 12(6):1403-1411
- Nagai Y, Nishimura A, Tago K, Mizuno N, Itoh H. (2010) “Ric-8B stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination” *J Biol Chem.* ;285(15):11114-20

- Nishimura A, M Okamoto, Y Sugawara, N Mizuno, J Yamauchi, H Itoh (2006) “Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells” *Genes Cells*. 11(5):487-498
- Offermanns S (2003) “G-proteins as transducers in transmembrane signalling” *Prog Biophys Mol Biol*. 83(2):101-130
- Parmeggiani F, R Pellarin, AP Larsen, G Varadamsetty, MT Stumpp, O Zerve, A Caflisch, A Plückthun (2008) “Designed armadillo repeat proteins as general peptide binding scaffolds: consensus design and computational optimization of the hydrophobic core” *J Mol Biol* 376:1282-1304
- Pastén P. (2010) “Caracterización funcional de Ric-8B humano” Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
- Quevillon E, Silventoinen V, Pillai S, Harte N, Mulder N, Apweiler R, Lopez R. (2005) “InterProScan: protein domains identifier” *Nucleic Acids Res*. 33(Web Server issue):W116-20.
- Rossman KL, CJ Der, J Sondek (2005) “GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors” *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(2):167-80
- Romo X, Pastén P, Martínez S, Soto X, Lara P, de Arellano AR, Torrejón M, Montecino M, Hinrichs MV, Olate J (2008) “xRic-8 is a GEF for G α and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes” *J Cell Physiol*. 214(3):673-80.
- Schade M, N Reynolds, C Dollins, K Miller (2005) “Mutations That Rescue the Paralysis of *Caenorhabditis elegans* ric-8 (Synembryn) Mutants Activate the G α s Pathway and Define a Third Major Branch of the Synaptic Signaling Network” *Genetics* 169:631-649
- Schultz J, F Milpetz, Bork, CP Ponting (1998) “SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains” *Proc. Natl. Acad. Sci*. 95:5857-5864
- Shimizu K, Kawabe H, Minami S, Honda T, Takaishi K, Shirataki H, Takai Y (1996) “SMAP, an Smg GDS-associating protein having arm repeats and phosphorylated by Src tyrosine kinase” *J Biol Chem*. 271(43):27013-7
- Söding, J., Biegert, A., and Lupas, A.N. (2005). “The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction”. *Nucleic Acids Research* 33: W244-W248
- Sprang S (2001) “GEFs: master regulators of G-protein activation” *Trends Biochem Sci*. 26(4):266-267
- Tall G, A Krumins, A Gilman (2003) “Mammalian RIC-8A (Synembryn) Is a Heterotrimeric G α Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor” *JBC* 278(10):8356-

- Tall G, A Gilman (2004) "Purification and Functional Analysis of RIC-8A: A Guanine Nucleotide Exchange Factor for G-Protein alpha Subunits" *Methods Enzymol* 390:377-388
- Tall G, A Gilman (2005) "Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of Galpha1-GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/Galpha1-GDP complexes" *Proc Natl Acad Sci* 102(46):16584-16589
- Thomas CJ, Tall GG, Adhikari A, Sprang SR. (2008) "Ric-8A catalyzes guanine nucleotide exchange on G alpha1 bound to the GPR/GoLoco exchange inhibitor AGS3" *J Biol Chem.* 283(34):23150-60
- Tonissoo T, S Koks, R Meier, S Raud, M Plaas, E Vasar, A Karis (2006) "Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety" *Behav Brain Res.* 167(1):42-8
- Unneberg, P., Merelo, J.J., Chacón, P., and Morán, F. (2001). SOMCD: Method for evaluating protein secondary structure from UV circular dichroism spectra. *Proteins: Structure, Function, and Genetics.* 42:460-470
- Von Dannecker LE, A. Mercadente, B. Malnic (2005) "RIC-8B, an Olfactory Putative GTP exchange Factor, Amplifies Signal Transduction through the Olfactory-Specific G-Protein Golf" *J Neurosci* 25(15):3793:3800
- Wang H, KH Ng , H Qian, DP Siderovski, W Chia, F Yu (2005) "Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins" *Nat Cell Biol.* 11:1047-1049
- Williams C, EE Galyov, S Bagby (2004) "solution structure, backbone dynamics, and interaction with Cdc42 of Salmonella guanine nucleotide exchange factor SopE2" *Biochemistry.* 43(38):11998-2008
- Wiederstein M, Sippl MJ. (2007) "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins". 35(Web Server issue):W407-W410
- Zhang B, Y Zhang, E Shacter, Y Zheng (2005) "Mechanism of the guanine nucleotide exchange reaction of Ras GTPase--evidence for a GTP/GDP displacement model" *Biochemistry.* 44(7):2566-2576
- Zhang, Y. (2008). "I-TASSER server for protein 3D structure prediction". *BMC Bioinformatics.* 23:9-40

IX. ANEXOS

IX.1.- Publicaciones (los trabajos publicados están anexados al final de este capítulo)

1.- Publicación generada a partir de la Tesis Doctoral

1. **“Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric-8”**

Figueroa M, Hinrichs MV, Bunster M, Babbitt P, Martinez-Oyanedel J, Olate J. *Protein Sci.* 2009 Jun;18(6):1139-45.

2.- Otras publicaciones generadas durante la permanencia en el Programa de Doctorado

1. **“A semiempirical approach to the intra-phycoyanin and inter-phycoyanin fluorescence resonance energy-transfer pathways in phycobilisomes”**

Matamala AR, Almonacid DE, **Figueroa MF**, Martínez-Oyanedel J, Bunster MC. *J Comput Chem.* 2007 May;28(7):1200-7.

2. **“The structure at 2 Å resolution of Phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC-PC complex”**

Contreras-Martel C, Matamala A, Bruna C, Poo-Caamaño G, Almonacid D, **Figueroa M**, Martínez-Oyanedel J, Bunster M. *Biophys Chem.* 2007 Feb;125(2-3):388-96.

3. **“Blockade of ethanol-induced potentiation of glycine receptors by a peptide that interferes with Gbetagamma binding”**

Guzman L, Moraga-Cid G, Avila A, **Figueroa M**, Yevenes GE, Fuentealba J, Aguayo LG *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Dec;331(3):933-9

4. **“In situ photoacoustic spectroscopy of phycobiliproteins in *Gracilaria chilensis*”**

R. Saavedra, **M. Figueroa**, T. Wandersleben, L. Pouchucq, J.E. Morales, M. Bunster and A. Cruz-Orea
J. Phys. IV France 2005, 125: 765-767

5. **“Molecular requirements for ethanol differential allosteric modulation of glycine receptors based on selective Gβγ modulation”**

Yevenes GE, Moraga-Cid G, Avila A, Guzman L, **Figueroa M**, Peoples RW, Aguayo LG
Enviando a J Biol Chem

6. **“Identification of a selective intracellular site for general anaesthetics in inhibitory cys-loop receptors”**

Moraga-Cid G, Yevenes GE, **Figueroa M**, Bunster M, Schmalzing G, Peoples RW, Aguayo LG
Enviado a Anesthesiology

7. **“Phycoerythrobilin and phycourobilin spectroscopy; the chromophores of r-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer constants”**
Sepúlveda-Ugarte J, Brunet J, Matamala AR, Martínez-Oyanedel J, **Figueroa M**, Bunster M.
Enviado a Biophysical Journal
8. **“The basic physicochemical property of the cytoplasmatic residue K385 of the human $\alpha 1$ GlyR regulate ethanol sensitivity”**
Patricio A Castro, Gustavo Moraga-Cid, Gonzalo E Yevenes, **Maximiliano Figueroa**, Ariel S Avila & Luis G Aguayo
En redacción
9. **“A Theoretical model of energy transfer in a minimum antenna of phycobilisome from *Gracilaria chilensis*”**
Figueroa M, Sepúlveda-Ugarte J, Mella C, Bruna C, Martínez-Oyanedel J, Bunster M
En redacción

IX.2 Presentaciones a congresos durante la permanencia en el programa de doctorado

1.- Congresos internacionales

1. “The light conduction in an antenna of a phycobilisome”. Sepulveda-Ugarte JR, **Figueroa M**, Martínez-Oyanedel J, Bunster M. 54th Annual Meeting of Biophysical Society (San Francisco, February 2010)
2. “Multiples residues along the $\alpha 2$ glycine receptor control ethanol sensitivity” Moraga-Cid, G., Yévenes, GE., Guzmán, JL., **Figueroa, M.**, Peoples, RW., Aguayo, LG. Annual meeting of the Society for Neuroscience, Chicago, IL. USA. 2009
3. “Structural studies of a phycobilisome”. Bunster M, Bruna CE, Martinez-Oyanedel J, **Figueroa M**, Meza C, Sepulveda JR, Matamala A. 53th Annual Meeting of Biophysical Society (Boston, USA, March 2009)
4. “Bioinformatic and spectroscopic analysis reveal an “armadillo” folding for *Xenopus laevis* RIC-8” **Figueroa, M.**, Bunster, M., Olate, J., Martínez-Oyanedel, J. XI Congress of Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (Águas de Lindóia, Sao Paulo, Brazil, may 2008)
5. “Relevance of the cytoplasmic domain N-terminal region of the Glycine Receptor in the binding of $G\beta\gamma$ ”. J. L. Guzman, A. Avila, J. Fuentealba, G. Yevenes, **M. Figueroa**, L. Aguayo 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. (San Diego, USA. Noviembre 2007)
6. “Molecular Determinants for the Interaction Between Glycine Receptor and the $G\beta\gamma$ Heterodimer” Guzmán, J.L.; Yévenes, G; Moraga, G; **Figueroa, M**; Olate, J; Aguayo, L. Society for Neuroscience. (Atlanta, Georgia, USA, november 2006)
7. “Conduction of Light in a Minimum Model for a Rod in PBS from *Gracilaria chilensis*”

M. Figueroa., D. Almonacid, J. Martínez-Oyanedel, M. Bunster. 10th Congress of Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology. (Pinamar, Argentina, december 2005)

2.- Congresos nacionales

1. “Múltiples residuos controlan la sensibilidad de la subunidad $\alpha 2$ de receptor de glicina a etanol” (Multiple residues are controlling the sensibility of $\alpha 2$ subunit from Glycine Receptor to Ethanol). Moraga-Cid G, Yévenes G, Guzmán L, **Figueroa M**, Peoples R, Aguayo LG. XXIII Reunión Anual Sociedad Biología Celular de Chile (Pucón, Chile, November 2009)
2. “Concentraciones farmacológicas de etanol modulan positivamente a un receptor quimérico $\alpha 1$ RGli- $\gamma 2$ RGABAA” (Pharmacological concentrations of ethanol positively modulate a chimeric $\alpha 1$ GlyR- $\gamma 2$ GABAA receptor) Castro P, Guzmán L, Ávila A, **Figueroa M**, Aguayo LG. XXIII Reunión Anual Sociedad Biología Celular de Chile (Pucón, Chile, November 2009)
3. “Identificación de sitios para las acciones de etanol y anestésicos generales en receptores inhibitorios” (Identification of sites for ethanol and general anesthetic actions on inhibitory receptors) Aguayo LG, Moraga-Cid G, Yevenes G, **Figueroa M**, Bunster M, Peoples R, Schmalzing G. XXXI Congreso Anual Sociedad de Farmacología de Chile (Concepción, Chile, october 2009)
4. “RIC-8: un nuevo GEF para proteínas G heterotriméricas con múltiples funciones” (RIC-8: a new GEF for heterotrimeric G proteins with multiple functions) Olate J, Pasten P, Campos T, Maureira A, Maldonado R, Torrejon M, **Figueroa M**, Hinrichs MV. XXXI Congreso Anual Sociedad de Farmacología de Chile (Concepción, Chile, october 2009)
5. “Un residuo de fenilalanina conservado en receptores de Glicina y GABAA es clave para su modulación por propofol” (A phenylalanine residue conserved in glycine and GABAA receptors is critical for their modulation by propofol) Moraga-Cid G, Yevenes G, **Figueroa M**, Bunster M, Peoples R, Schmalzing G, Aguayo LG. XXXI Congreso Anual Sociedad de Farmacología de Chile (Concepción, Chile, october 2009)
6. “Dominios intracelulares de R-GABA(A) interactúan positivamente con dímeros G $\beta\gamma$. Evaluación de la sensibilidad a etanol de un receptor quimérico entre $\alpha 1$ R-Gli y $\gamma 2$ R-GABA(A)” (Intracellular domains of GABA(A)R interact positively with G $\beta\gamma$ dimmers. Evaluation of the ethanol sensitivity on chimeric $\alpha 1$ GlyR – $\gamma 2$ GABA(A) receptor) Castro PA, **Figueroa M**, Guzman L, Avila A, Aguayo LG. XXXI Congreso Anual Sociedad de Farmacología de Chile (Concepción, Chile, october 2009)
7. “Estudio a través de mutantes de delección para determinar la región con actividad GEF de xRIC-8 basado en un modelo tridimensional” (Studies trough deletion mutants to determine the region with GEF activity of xRIC-8 based in a 3D model) **Figueroa M**, Hinrichs MV, Martínez-Oyanedel J, Olate J. XXXII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, (Termas de Chillán, Chile, september 2009)

8. “Determinación de las vías preferenciales de transferencia de luz en R-Ficoeritrina de *Gracilaria chilensis*” (Determination of preferential pathways for light conduction in R-Phycocyanin from *Gracilaria chilensis*) Sepúlveda-Ugarte J, **Figueroa M**, Martínez-Oyanedel J, Bunster M. XXXII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, (Termas de Chillán, Chile, september 2009)
9. “Estudios in silico del estado de oligomerización de Aloficocianina” (In silico studies of allophycocyanin oligomerization states) Cifuentes, J., **M. Figueroa**, M. Bunster, J. Martínez-Oyanedel. XXX Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, (Termas de Chillán, Chile, september 2007)
10. “Identificación de proteínas que interaccionan con RIC-8 de *Xenopus laevis*” (Identification of proteins that interact with RIC-8 of *Xenopus laevis*) Lara, P., M. Torrejón, **M. Figueroa**, P. Pastén, M. Montecino, MV. Hinrichs, J. Olate. XXX Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (Termas de Chillán, Chile, september 2007)
11. “h-RIC8B Actua como GEF para $G\alpha_s$ in vivo” (hRIC8B act as GEF to $G\alpha_s$ in vivo) Pastén, P., **M. Figueroa**, J. Olate, MV. Hinrichs. XXX Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (Termas de Chillán, Chile, september 2007)
12. “Purificación y Análisis de Estructura-Función de RIC-8 de *Xenopus laevis*” (Purification and Structure-Function Analysis of RIC-8 of *Xenopus laevis*) **M. Figueroa**, A. Ramírez de Arellano, M. Torrejón, J. Martínez-Oyanedel, M. Bunster, M. Montecino, MV. Hinrichs, J. Olate. XXIX Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile. (Pucón, Chile, november 2006)
13. “Estudios Teórico Experimentales de Subcomplejos de Ficobilisomas de *Gracilaria chilensis*” (Theoretical-Experimental Studies for Phycobilisomes subcomplex of *Gracilaria chilensis*) **M. Figueroa**, J. Martínez-Oyanedel, M. Bunster. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (Talca, Chile, january 2006)
14. “Estudios del Estado de Oligomerización de Ficobiliproteínas por Herramientas Bioinformáticas” (Studies of oligomerization states of Phycobiliproteins by Bioinformatics Tools) Martínez-Oyanedel, J., J. Sepúlveda, JR Cabrera, F. Burgos, **M. Figueroa**, M. Bunster. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile (Talca, Chile, january 2006)
15. “Residuos Conservados en la Superficie de Interacción son Responsables de la Estructura Cuaternaria en Ficobiliproteínas de *Gracilaria chilensis*” (Conservate Residues in the Interaction Surface are Responsables of the Quaternary Structure in Phycobiliproteins of *Gracilaria chilensis*) Sepúlveda, J., JR Cabrera, F. Burgos, **M. Figueroa**, M. Bunster, J. Martínez-Oyanedel. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile (Pucón, Chile, october 2005)

Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric-8

Maximiliano Figueroa,¹ María Victoria Hinrichs,¹ Marta Bunster,¹ Patricia Babbitt,² José Martínez-Oyanedel,¹ and Juan Olate^{1*}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

²Department of Biopharmaceutical Sciences, California Institute for Quantitative Biosciences, University of California at San Francisco, San Francisco, California

Received 23 January 2009; Revised 10 March 2009; Accepted 16 March 2009

DOI: 10.1002/pro.124

Published online 7 April 2009 proteinscience.org

Abstract: Ric-8 is a highly conserved cytosolic protein (MW 63 KDa) initially identified in *C. elegans* as an essential factor in neurotransmitter release and asymmetric cell division. Two different isoforms have been described in mammals, Ric-8A and Ric-8B; each possess guanine nucleotide exchange activity (GEF) on heterotrimeric G-proteins, but with different G α subunits specificities. To gain insight on the mechanisms involved in Ric-8 cellular functions it is essential to obtain some information about its structure. Therefore, the aim of this work was to create a structural model for Ric-8. In this case, it was not possible to construct a model based on comparison with a template structure because Ric-8 does not present sequence similarity with any other protein. Consequently, different bioinformatics approaches that include protein folding and structure prediction were used. The Ric-8 structural model is composed of 10 armadillo folding motifs, organized in a right-twisted α -alpha super helix. In order to validate the structural model, a His-tag fusion construct of Ric-8 was expressed in *E. coli*, purified by affinity and anion exchange chromatography and subjected to circular dichroism analysis (CD) and thermostability studies. Ric-8 is approximately 80% alpha helix, with a T_m of 43.1°C, consistent with an armadillo-type structure such as α -importin, a protein composed of 10 armadillo repeats. The proposed structural model for Ric-8 is intriguing because armadillo proteins are known to interact with multiple partners and participate in diverse cellular functions. These results open the possibility of finding new protein partners for Ric-8 with new cellular functions.

Keywords: Ric -8; GEF; threading; armadillo; bioinformatics

Grant sponsor: CONICYT Research; Grant number: 1090150(JO); Grant sponsor: CONICYT Travel Fellowship (MF).

*Correspondence to: Juan Olate, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile. E-mail: jolate@udec.cl

Introduction

Ric-8 proteins have been implicated in two different main cellular functions: signaling regulation through G-proteins and asymmetric cell division during embryonic development.^{1,2} Genetic analyses performed in *C.elegans*, have shown that Ric-8 is essential for synaptic transmission³ and that its encoded protein is a

conserved novel protein required for $G\alpha_q$ and $G\alpha_o$ signaling.¹ Also it was observed that Ric-8 is involved in the regulation of centrosome movements during early embryogenesis.² The mechanism of action of Ric-8 was unknown until 2003, when Tall *et al.*,⁴ used two-hybrid screening to isolate two mammalian isoforms of Ric-8, Ric-8A, and Ric-8B, that possessed the ability to interact with G protein α subunits. *In vitro* biochemical characterization of Ric-8A showed that it is able to stimulate the GDP/GTP exchange of $G\alpha_i$ and $G\alpha_q$, but not of $G\alpha_s$, acting therefore as a receptor-independent GEF for heterotrimeric G proteins.⁴ At the same time, our group reported the interaction of human Ric-8B with $G\alpha_s$ and $G\alpha_q$ and demonstrated its translocation to the plasma membrane in response to the activation of the corresponding G protein.⁵ Interestingly, in contrast to the mechanism used by GPCRs that act on the heterotrimeric form of G proteins, Ric-8 interacts and stimulates the GDP/GTP exchange on the dissociated $G\alpha$ subunit in the absence of $G\beta\gamma$.⁴

In *C. elegans* embryos, Ric-8 participates controlling the spindle position by modulating $G\alpha$ activity⁶ and the molecular machinery involved in this process is constituted by a complex formed between Ric-8, the nuclear mitotic apparatus protein N μ MA, $G\alpha_i$ -GDP and PINS.⁷ In this work it was found that Ric-8A induces the dissociation of the complex formed by $G\alpha_i$ -GDP/LGN/N μ MA *in vitro*, releasing activated $G\alpha_i$ -GTP and N μ MA from LGN. Based on these observations, the authors proposed that Ric-8A could be participating in regulating microtubule pulling forces on centrosomes during cell division by catalyzing the dissociation of the $G\alpha_i$ -GDP/PIN/N μ MA complex. This hypothesis was confirmed, through studies conducted in *D. melanogaster* and *C. elegans* which showed that interaction between Ric-8 and $G\alpha_i1$ was essential for cortical localization of $G\alpha_i1$ and asymmetric cell division.^{6,8–11} In addition, studies performed in dividing mammalian cells demonstrated that over expression of LGN and $G\alpha_i3$ affect the cortical position of the mitotic spindle in symmetrically dividing cells.¹²

Demonstration of the role of Ric-8A and Ric-8B in G protein signaling regulation came from *in vivo* studies performed by different groups, which showed that Ric-8 proteins are able to potentiate $G\alpha_q$, $G\alpha_{olf}$ and $G\alpha_s$ -mediated signal transduction by acting downstream of their corresponding GPCRs.^{13–16}

These observations are consistent with Ric-8 acting as a multifunctional protein with the ability to interact with many other proteins besides $G\alpha$ subunits. Therefore, in order to better understand the cellular functions described for Ric-8, it is essential to know its structure, which at present is unknown. For this reason, the aim of this study was to construct a structural model for Ric-8, through the application of different bioinformatics methods that include folding recognition (threading). The results obtained indicate the

presence of an α -alpha super helix folding, which represents the armadillo structure according to SCOP classification.¹⁷ Based on this initial folding prediction, we constructed a refined model using proteins with known armadillo structures as templates.^{18,19} To corroborate our structural model, we expressed *Xenopus laevis* Ric-8 in *E. coli* and the purified protein was subjected to circular dichroism (CD) spectroscopy analysis and thermo stability studies. The spectrum obtained clearly indicated a high level of alpha helix secondary structure and was similar to other proteins composed of armadillo domains.^{20,21}

Results and Discussion

Ric-8 is an armadillo type protein

To construct a structural model for Ric-8, we first performed a BLAST analysis comparing the *Xenopus laevis* Ric-8 (xRic-8) amino acid sequence (AAZ23806) with protein data bases (Swissprot and PDB). This analysis revealed that Ric-8 belongs to a unique protein family with no homology to other proteins, making difficult to find a template structure to construct a protein model. The second analysis carried out was a secondary structure prediction study, which showed an exceptionally high level of α -helix content for xRic-8 [Fig. 1(B)]. Based on the fact that proteins with different amino acid sequences can share conserved structures, we hypothesized that xRic-8 might be structured by a type of folding previously reported for other proteins. To test our hypothesis, we followed the folding recognition approach and analyzed xRic-8 primary sequence through five different Web servers. Table I shows the five methods used to perform the folding recognition analysis and the top five proteins identified by each method. Interestingly, almost all of them, especially the ones with rank 1 or 2, propose an armadillo-type folding for xRic-8, which is in accordance with our secondary structure prediction analysis [Fig. 1(B)]. The armadillo fold, is composed by a right-handed super helical structure formed by three alpha helices folded in a triangle shaped structure, repeated several times and stacked to form a compact domain. Numerous proteins are known to display armadillo folding, with β -catenin the best known and representative example of this protein family. One characteristic of armadillo proteins is their capacity to interact with multiple protein partners and consequently to be involved in a broad range of biological processes such as transcription regulation, cell adhesion, tumor suppressor activity and nucleo-cytoplasmic transport.¹⁹ Interestingly, this feature, of forming protein complexes with several other proteins, has also been observed for xRic-8 by our group (unpublished data). Using xRic-8 as bait, we have identified through a yeast two-hybrid screening two very attractive proteins called DasRa and INCENP, which are constituents of the chromosome passenger complex (CPC), a protein

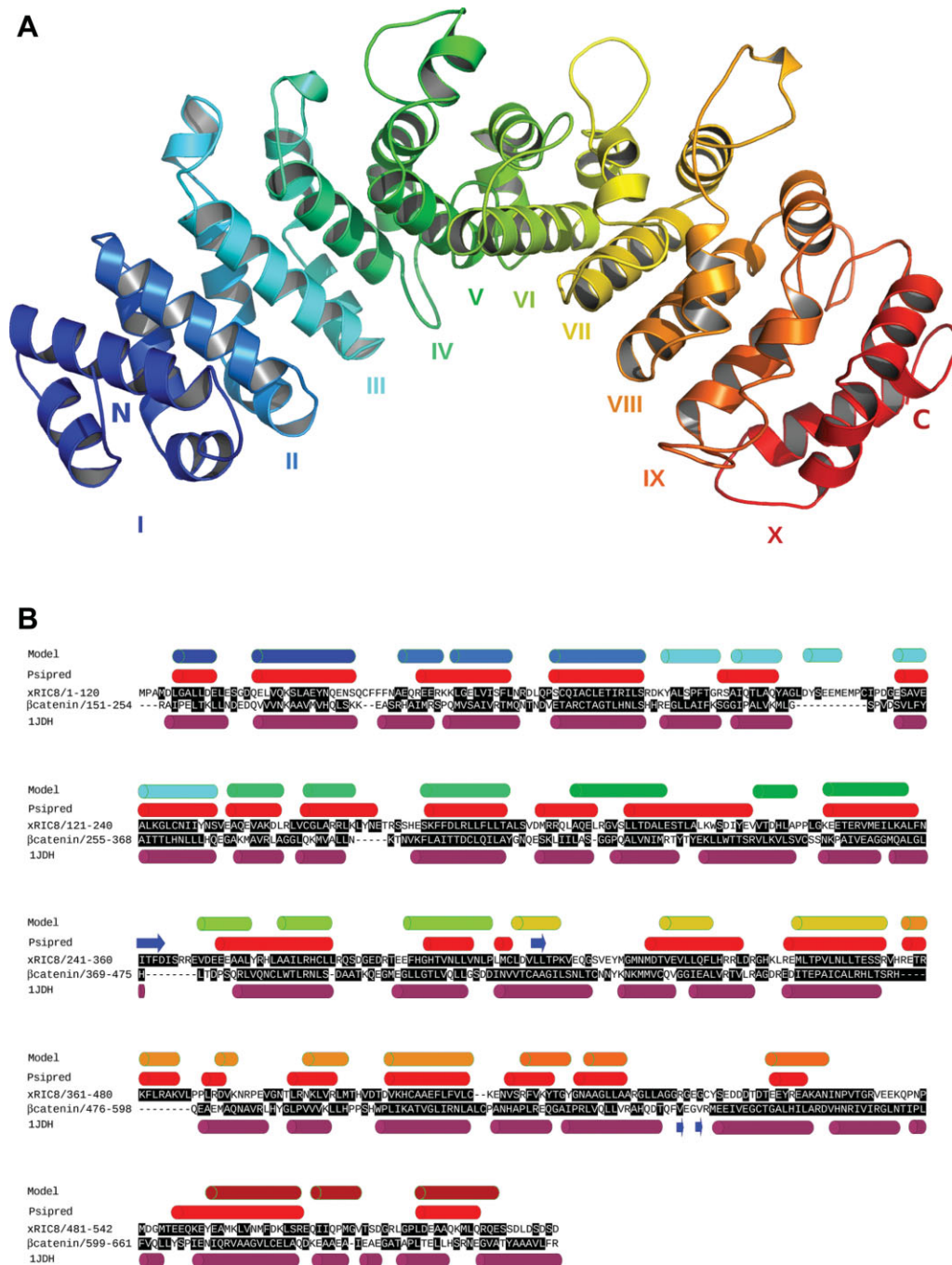


Figure 1. 3D model of xRic-8 (A) Lateral view of xRic-8 predicted structure showing the 10 armadillo domains repeated in tandem along the protein. The amino and carboxylic ends of the protein are indicated by the capital letters N and C, respectively. Each armadillo repeat is designated by roman numbers and illustrated with different colors. (B) Comparative primary and secondary structure of xRic-8 and β -catenin. Predicted secondary structure of xRic-8 obtained with Psipred is shown in red cylinders (Psipred) and of the 3D model is shown in different color cylinders (Model), in which each color corresponds to a different armadillo repeat as shown in panel A. β -catenin secondary structure (based on its known tertiary structure, 1JDH) is shown in purple cylinders. Buried aminoacids are highlighted in black boxes.

complex that controls chromosome segregation and cytokinesis.²²

Ric-8 3D model generation

After an armadillo type of folding was discovered for xRic-8, and in the absence of a template to build a

homology model, two different approaches were followed to face this problem. First, a refined model was constructed using as template the human β -catenin tertiary structure. The xRic-8 structural model was build using the MODELLER Web server,²³ by aligning the secondary structures of both proteins and

Table I. *Methods for Folding Recognition*

Ranking	Methods				
	HHPRED	I-TASSER	3D-JURY	PSIPRED	SP4
1	β-catenin (2z6h)	α-importin (1ejl)	β-catenin (1jdh)	α-importin (2jdq)	plakofilin 1 (1xm9)
2	α-importin (1y2a)	β-catenin (1jdh)	β-catenin (1i7w)	plakofilin 1 (1xm9)	α-importin (1ee4)
3	HSPBP1 (1xqr)	α-importin (1ee4)	α-importin (1q1s)	RSR (2nvo)	β-catenin (1jdh)
4	β-catenin (1jdh)	plakofilin 1 (1xm9)	α-importin (1ial)	PR65a (1b3u)	6-PGDase (1wdk)
5	α-importin (1jdq)	β-adaptin (1gw5)	α-importin (2jdq)	α-importin (2c1m)	β-adaptin (1gw5)

The table show the top 5 folding obtain from each method. Protein PDB codes are shown in parentheses. Bold indicates proteins with armadillo folding.

conserving the main chain trace. The model was then refined with the SCWRL program,²⁴ which corrected the positions of the side chains and placed them in the most favorable location, according to the local backbone conformation. This analysis allowed us to eliminate side chain steric clashes, by changing the energetically incorrect conformation of several amino acids and improving the hydrogen bond network. Finally, energy minimization was performed using GROMACS with Gromos 9643b1 force field,²⁵ which allowed us to relax the structure, improving the interactions in the core of the protein model and minimizing any error.

The second strategy, was to build a structural model using the web server I-Tasser,²⁶ which is a hierarchical protein structure modeling approach based on the secondary-structure enhanced Protein-Profile threading Alignment (PPA). The I-Tasser algorithm consists of three consecutive steps of threading, fragment assembly and iteration. In this method, the target sequence is first threaded through the PDB structure library to identify appropriate local fragments, which will be adopted for further structural reassembly. The unaligned regions (mainly loops) are built by *ab initio* modeling and finally all fragments are reassembled and the representative structure of each cluster is optimized and ordered by lowest energy.

Through both methodologies, we obtained similar results: a structural model for xRic-8 with 10 armadillo domains [Fig. 1(A)]. Analysis of these models with Ramachandran plot, showed that more than 90% of the residues are in a favorable conformation, and energetic analysis performed with Prosa²⁷ showed that the I-Tasser model was energetically more favorable (data not shown).

Another analysis that we made in order to validate our model, was to do an alignment comparison between the secondary structure of our xRic-8 structural model and β -catenin. As can be seen in Figure 1(B), very similar arrangements along the sequences of the α -helices that form the different domains are exhibited. The buried aminoacids, highlighted in black boxes, are also well conserved in both structures. For β -catenin, the percentage of buried aminoacids that are hydrophobic is 64% (as deduced from its known tertiary structure) and for xRic-8 is 59% (as deduced from our model), and hydrophilic exposed aminoacids

are also very similar in both proteins, being 67% for β -catenin and 76% for xRic-8. In summary, all these features together strongly support and validate our structural model for xRic-8 and allow us to propose it as a member of the armadillo family.

Circular dichroism analysis confirms bioinformatics predictions

To test the proposed model we expressed recombinant His-tagged xRic8 in *E. coli* and subjected the purified protein (see Fig. 2) to biophysical analysis. The high alpha helical content, previously found by secondary structure prediction and fold recognition analysis, was confirmed by circular dichroism. As illustrated in Figure 3(A), the CD spectrum obtained for xRic-8 corresponds to the typical curve displayed by α -helical proteins, showing a minimum at 208 and 222 nm. Quantification of xRic-8 alpha helical content, by deconvolution of the circular dichroism spectra, gave a value of 82%. These results support the threading 3D

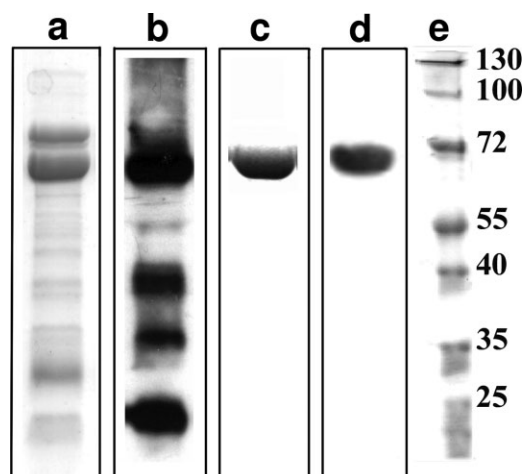


Figure 2. SDS-PAGE and Western Blot analysis of purified xRic-8. Lanes a and c show SDS-PAGE analysis for xRic-8 pooled fractions collected from Ni²⁺-agarose affinity chromatography and HiLoad-Q anion exchange chromatography, respectively. Lanes b and d show Western Blot analysis for the proteins observed in lanes a and c respectively. Lane e contains protein molecular weight standards. The protein show in c was used for CD spectroscopic analysis.

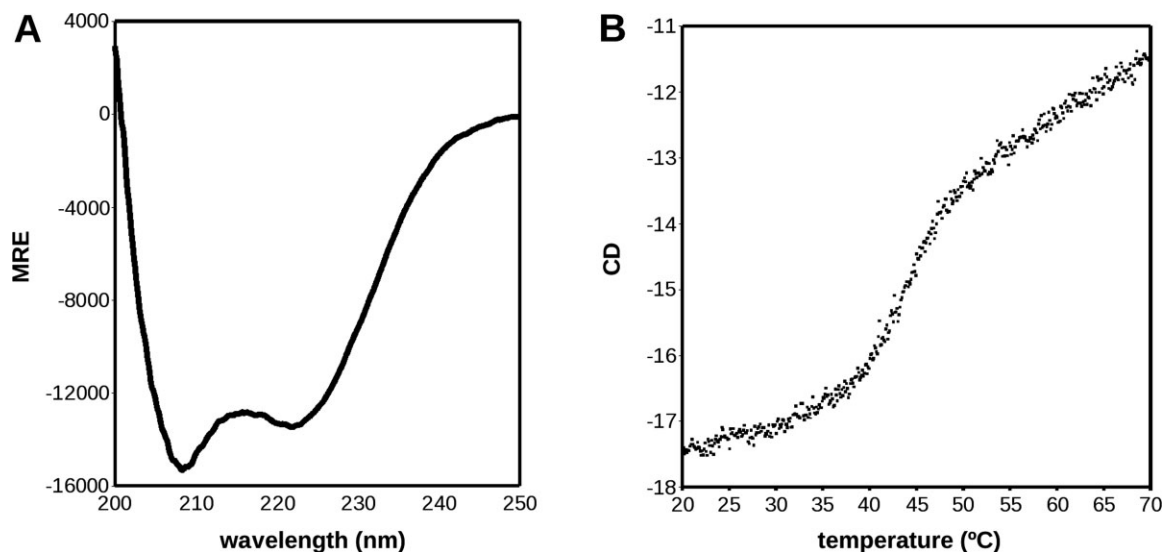


Figure 3. CD Spectrum of xRic-8 and Thermo-stability assay A) The CD spectrum shown is typical of a protein with high level of α -helix content, with well-defined minimums at 208 and 222 nm. The deconvolution of the spectrum with SOMCD software indicated 80% of helix content. B) The Thermo-stability assay show that xRic-8 is a protein with two structural states (folded and unfolded) with a T_m of $43.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$

model obtained by us for xRic-8 and are in good agreement with reported biophysical characteristics of polypeptides containing different number of armadillo domains, β -catenin and α -importin, which displayed an alpha helical content between 40% and 85%, in concordance with the amount of armadillo motifs present in the protein.²⁸ Interestingly, this kind of folding has also been reported for another GEF protein.²⁹

To better characterize xRic-8, we also studied its thermo stability by measuring its ellipticity at the minimum of 222 nm in a range of temperature between 20 and 70°C [Fig. 3(B)]. The denaturation curve that was obtained is typical of a protein with two structural states with a T_m of $43.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and a ΔH_{VH} of 394.6 Kcal/mol. The reversibility of the folding was 75% (data not shown). Interestingly, the T_m obtained for xRic-8 is almost identical to that obtained for α -importin by Parmeggiani *et al.*, which was 43°C .²⁸ This result strongly supports our structural model because α -importin possesses 10 armadillo domains, the same number we are proposing for xRic-8. Parmeggiani *et al.*²⁸ in their study, also suggest a direct relationship between the number of armadillo domains and the T_m of the protein. Consistent with this proposal, β -catenin, that contains 12 armadillo repeats, shows a T_m of 58°C .

In summary, the CD spectroscopic analysis and the thermo-stability assay strongly support the structural model we have obtained for xRic-8; consequently we can propose it as a new member of the armadillo family of proteins. The fact that Ric-8 is a member of this family is exciting, because armadillo proteins have been shown to act as “scaffold proteins,” interacting

with a diverse set of partners and participating in many signalling pathways.

Methodology

Expression and purification of xRic-8

In order to express xRic-8 in bacteria, the corresponding cDNA was subcloned into the pQE81-L vector (Quiagen, Valencia, CA U.S.A.) fused to a hexa-histidine tag at its amino terminus. *E.coli* BL-21(DE3), harboring the plasmid pQE81-L/xRic-8, were grown in 4 L of LB medium with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicillin at 25°C to an OD_{600} of 0.4. Protein expression was then induced by the addition of 50 μM IPTG and incubated for 2 h at the same temperature. After centrifugation, the cell pellet was resuspended in 30 mL of buffer A (50 mM phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 20 mM imidazole, and a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche)) and disrupted by sonication. The crude cell lysate was then cleared by centrifugation at 100,000g for 60 min. and the supernatant loaded onto a 3 mL Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid-agarose resin column (NI-NTA, Novagen), equilibrated in buffer A. After washing the column with 5 volumes of buffer A, the bound proteins were eluted with buffer B (50 mM phosphate, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoethanol, 100 mM imidazole and cocktail of protease inhibitors). Ten 1 mL fractions were collected and 5 μL of each analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. To confirm the expression of recombinant xRic-8, fractions were also subjected to Western blot analysis, using an anti-His antibody (Clontech). xRic-8 containing fractions were pooled and concentrated by centrifugation in a

Centricon tube (Millipore) and imidazole removed by performing several dilutions and centrifugations in buffer 20 mM HEPES, pH 8.0, 250 mM NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol and 1 mM PMSF. Partially purified xRic-8 was then loaded onto a HiLoad Q sepharose (GE) ion exchange chromatography column, equilibrated in a buffer containing 20 mM HEPES, pH 8.0, 250 mM NaCl, 5 mM 2-mercaptoethanol and 1 mM PMSF. After washing the column with two volumes of the same buffer, the protein was eluted with a linear gradient between 250 and 500 mM NaCl with a flux of 1 mL/min during 100 min. Fractions were analyzed by SDS-PAGE, stained with Coomassie blue and also by western blotting using an anti-His antibody. Fresh purified protein was used in all spectral analysis.

CD spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra was performed over a range of 200–250 nm with 0.1 nm increments at a scan speed of 50 nm/min in a Jasco J-715 CD spectropolarimeter. The final concentration of xRic-8 in the analysis was 2.33 mg/mL in buffer 50 mM phosphate pH 8.0 and 200 mM NaCl. Three different samples were scanned in a 1 mm quartz cuvette and the data transformed to MRE (Mean Residue Ellipticity). The contribution of the buffer was subtracted from each value. To estimate the percentage of secondary structure, the CD spectrum was analyzed with the SOMCD software.³⁰

To study the thermo stability of xRic-8, a heat denaturation curve was performed by measuring the CD signal at 222 nm in the same buffer used for the CD spectra, at a temperature between 20 and 70°C. The temperature was raised at 0.1°C intervals at a ramp rate of 2°/min, using a Peltier-effect temperature controller and a in-cell temperature monitor. The unfolding melting temperature (T_m) and van't Hoff enthalpy (ΔH_{VH}) were calculated with EXAM.³¹

Folding recognition

In order to gain some insights on xRic-8 structure, its amino acid sequence was analyzed with five different Web servers for folding-recognition: HHPRED,³² I-TASSER,²⁶ 3D-Jury,³³ PSIPRED³⁴ and SP4.³⁵ All programs were used with the default parameters.

3D model generation

Two strategies were used to generate a 3D model of xRic-8:

- Using the MODELLER program on MODELLER servers,³³ utilizing the human β-catenin protein structure as template (PDB code: 1JDH). The model was first refined with the SCWRL program²⁴ to construct the side chains and subsequently energy-minimized with GROMACS.²⁵ The PROCHECK program was used for stereochemical analysis of the model.³⁶
- Using the web server I-Tasser, which is a method where the target sequence is first threaded through the PDB structure library to identify appropriate local fragments. After, the unaligned regions (mainly loops) are built by *ab initio* modeling and finally all fragments are reassembled and the representative structure of each cluster is optimized and ordered by energy minimization.

Both models were evaluated by Ramachandran plot,³⁶ Prosa server²⁷ and by calculating the characteristics of buried and exposed amino acids in the structure. An amino acid was defined as exposed, when the accessible surface area was higher than 25%.

References

- Miller KG, Emerson MD, McManus JR, Rand JB (2000) Ric-8 (synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q) alpha signaling in the *C.elegans* nervous system. *Neuron* 27: 289–299.
- Miller KG, Rand JB (2000) A role for RIC-8 (synembryn) and GOA-1 (G(o)α) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156: 1649–1660.
- Miller KG, Alfonso A, Nguyen M, Crowell JA, Johnson CD, Rand JB (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12593–12598.
- Tall GG, Krumins AM, Gilman AG (2003) Mammalian Ric-8A (Synembryn) is a heterotrimeric Gα protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 278: 8356–8362.
- Klattenhoff C, Montecino M, Soto X, Guzmán L, Romo X, García MD, Mellstrom B, Naranjo JR, Hinrichs MV, Olate J (2003) Human synembryn interacts with Gα and Gqα and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J Cell Physiol* 195: 151–157.
- Couwenbergs C, Spilker AC, Gotta M (2004) Control of embryonic spindle positioning and Gα activity by *C.elegans* RIC-8. *Curr Biol* 14: 1871–1876.
- Tall GG, Gilman AG (2005) Resistance to inhibitors of cholinesterase 8A catalyzes release of Gαi-GTP and nuclear mitotic apparatus protein (NuMA) from NuMA/LGN/Gαi-GDP complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 16584–16589.
- Afshar K, Willard FS, Colombo K, Johnston CA, McCudden CR, Siderovski DP, Gonczy P (2004) RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galphai function during asymmetric division of *C.elegans* embryos. *Cell* 119: 219–230.
- David NB, Martin CA, Segalen M, Rosenfeld F, Schweisguth F, Bellaiche Y (2005) Drosophila Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 7: 1083–1090.
- Hampoelz B, Hoeller O, Bowman SK, Dunican D, Knoblich JA (2005) Drosophila Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol* 7: 1099–1105.
- Wang H, Ng KH, Qian H, Siderovski DP, Chia W, Yu F (2005) Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol* 7: 1091–1098.

12. Blumer JB, Kuriyama R, Gettys TW, Lanier SM (2006) The G-protein regulatory (GPR) motif-containing Leu-Gly-Asn-enriched protein (LGN) and $G\alpha_3$ influence cortical positioning of the mitotic spindle poles at metaphase in symmetrically dividing mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 85: 1233–1240.
13. Malik S, Ghosh M, Bonacci TM, Tall GG, Smrcka AV (2005) Ric-8 enhances G protein $\beta\gamma$ -dependent signaling in response to $\beta\gamma$ -binding peptides in intact cells. *Mol Pharmacol* 68: 129–136.
14. Von Dannecker LE, Mercadante AF, Malnic B (2005) Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein $G\alpha_{olf}$. *J Neurosci* 25: 3793–3800.
15. Nishimura A, Okamoto M, Sugawara Y, Mizuno N, Yamauchi J, Itoh H (2006) Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes Cells* 11: 487–498.
16. Romo X, Pastén P, Martínez S, Soto X, Lara P, Ramirez A, Torrejón M, Montecino M, Hinrichs M, Olate J (2008) xRic-8 is a GEF for $G\alpha_x$ and participates in maintaining meiotic arrest in *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Physiol* 214: 673–680.
17. Andreeva A, Howorth D, Chandonia JM, Brenner SE, Hubbard TJ, Chothia C, Murzin AG (2008) Data growth and its impact on the SCOP database: new developments. *Nucl Acids Res* 36: D419–D425.
18. Peifer M, Ber S, Reynolds AB (1994) A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* 76: 789–791.
19. Coates JC (2003) Armadillo repeat proteins: beyond the animal kingdom. *Trends Cell Biol* 13: 463–471.
20. Hirschl D, Bayer P, Müller O (1996) Secondary structure of an armadillo single repeat from the APC protein. *FEBS Lett* 383: 31–36.
21. Huber AH, Nelson WJ, Weis WI (1997) Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* 90: 871–882.
22. Ruchaud S, Carmena M, Earnshaw WC (2007) Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 798–812.
23. Ginalski K, Elofsson A, Fischer D, Rychlewski L (2003) 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics* 19: 1015–1018.
24. Canutescu AA, Shelenkov AA, Dunbrack RL (2003) A graph theory algorithm for protein side-chain prediction. *Protein Sci* 12: 2001–2014. <http://dunbrack.fccc.edu/SCWRL3.php>.
25. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E (2008) GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J ChemTheory Comput* 4: 435–447. <http://www.gromacs.org>.
26. Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 23: 9–40. <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER>.
27. Wiederstein M, Sippl MJ (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. 35(Web Server issue): W407–W410.
28. Parmeggiani F, Pellarin R, Larsen AP, Varadamsetty G, Stumpp MT, Zerbe O, Caflisch A, Plückthun A (2008) Designed armadillo repeat proteins as general peptide-binding scaffolds: consensus design and computational optimization of the hydrophobic core *J Mol Biol* 376: 1282–1304.
29. Vikis HG, Stewart S, Guan KL (2002) SmgGDS displays differential binding and exchange activity towards different Ras isoforms. *Oncogene* 21: 2425–2432.
30. Unneberg P, Merelo JJ, Chacón P, Morán F (2001) SOMCD: method for evaluating protein secondary structure from UV circular dichroism spectra. *Proteins Struct Funct Genet* 42: 460–470.
31. Kirchoff W (1993) EXAM: a two-state thermodynamic analysis program. Maryland: Gaithersburg.
32. Söding J, Biegert A, Lupas AN (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucl Acids Res* 33: W244–W248. <http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>.
33. Ginalski K, Elofsson A, Fischer D, Rychlewski L (2003) 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. *Bioinformatics* 19: 1015–1018. http://meta.bioinfo.pl/submit_wizard.pl.
34. McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16: 404–405. <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>.
35. Liu S, Zhang C, Liang S, Zhou Y (2007) Fold recognition by concurrent use of solvent accessibility and residue depth. *Proteins* 68: 636–645. <http://sparks.informatics.iupui.edu/SP4>.
36. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 26: 283–291.

Blockade of Ethanol-Induced Potentiation of Glycine Receptors by a Peptide That Interferes with G $\beta\gamma$ Binding

Leonardo Guzman, Gustavo Moraga-Cid, Ariel Avila, Maximiliano Figueroa, Gonzalo E. Yevenes, Jorge Fuentealba, and Luis G. Aguayo

Laboratory of Neurophysiology, Department of Physiology (L.G., G.M.-C., A.A., G.E.Y., J.F., L.G.A.) and Laboratory of Biophysics, Department of Biochemistry and Molecular Biology (M.F.), University of Concepción, Concepción, Chile

Received August 14, 2009; accepted September 21, 2009

ABSTRACT

The large intracellular loop (IL) of the glycine receptor (GlyR) interacts with various signaling proteins and plays a fundamental role in trafficking and regulation of several receptor properties, including a direct interaction with G $\beta\gamma$. In the present study, we found that mutation of basic residues in the N-terminal region of the IL reduced the binding of G $\beta\gamma$ to $21 \pm 10\%$ of control. Two basic residues in the C-terminal region, on the other hand, contributed to a smaller extent to G $\beta\gamma$ binding. Using docking analysis, we found that both basic regions of the IL bind in nearby regions to the G $\beta\gamma$ dimer, within an area of high density of amino acids having

an electronegative character. Thereafter, we generated a 17-amino acid peptide with the N-terminal sequence of the wild-type IL (RQH) that was able to inhibit the *in vitro* binding of G $\beta\gamma$ to GlyRs to $57 \pm 5\%$ of control in glutathione S-transferase pull-down assays using purified proteins. More interestingly, when the peptide was intracellularly applied to human embryonic kidney 293 cells, it inhibited the G $\beta\gamma$ -mediated modulations of G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel by baclofen ($24 \pm 14\%$ of control) and attenuated the GlyR potentiation by ethanol ($51 \pm 10\%$ versus $10 \pm 3\%$).

The glycine receptor (GlyR) is a member of the ligand-gated ion channel (LGIC) superfamily, and along with acetylcholine nicotinic receptors, serotonin receptors, and γ -aminobutyric acid (GABA)_A receptors, GlyR conforms the Cys-loop family. Its activation by glycine causes a rapid increase in Cl⁻ conductance, resulting in postsynaptic membrane hyperpolarization and leading to an effective inhibitory response. GlyRs are the main inhibitory LGICs in spinal cord and brain stem (Legendre, 2001), thus explaining their role in pain transmission, motor control, and cardiovascular and respiratory regulations. GlyRs are composed of $\alpha 1$ through $\alpha 4$ and β subunits, which are arranged as pentamers with all the ion-permeating function residing in the α subunits (Moss and Smart, 2001). The receptor can assemble as a functional membrane protein only with the combination of $\alpha 1$ subunits, making the examination of molecular determi-

nants for receptor activation, blocking, and modulation straightforward (Legendre, 2001). Each of the receptor subunits presents a large extracellular amino terminal domain, four transmembrane α helices (TM1–4), and a large intracellular loop (IL) between TM3 and TM4. The IL is relevant for GlyR function because it was reported that it can be modulated by activation of intracellular cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C (Aguayo et al., 1996; Tapia et al., 1997). GlyR modulation and the direct interaction with specific intracellular domains in the receptor have been recently documented (Yevenes et al., 2003, 2006). Furthermore, recent studies showed that, similar to nicotinic acetylcholine receptor (Fischer et al., 2005), the GlyR function can be directly modulated by G $\beta\gamma$. Together, these results clearly link this inhibitory receptor to specific intracellular signal transduction pathways.

Although it is recognized that taurine, β -alanine, Zn²⁺, neurosteroids, picrotoxin, and strychnine are important ligands acting on GlyR, their mechanism and sites of action are not well understood (Young and Snyder, 1974; Prince and Simmonds, 1992; Laube et al., 1995; Wu et al., 1997). Furthermore, previous studies have described that the function

This work was supported in part by the National Institutes of Health National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism [Grant AA15150]; Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico [Grant 11080145]; and CONICYT Bicentenario [Grant 7].

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.109.160440.

ABBREVIATIONS: GlyR, glycine receptor; LGIC, ligand-gated ion channels; GABA, γ -aminobutyric acid; TM, transmembrane; IL, intracellular loop; GIRK, G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel; GST, glutathione S-transferase; β ARK, β -adrenergic receptor kinase; GRK, G protein-coupled receptor kinase; NTIL, N-terminal intracellular loop; WT, wild type; CTIL, C-terminal intracellular loop; HEK, human embryonic kidney; ct, C-terminal.

of GlyRs was enhanced by pharmacological relevant concentrations of ethanol (≤ 100 mM). Supporting the idea that the effects of ethanol are partly mediated by signal transduction, ethanol actions on spinal GlyRs are modulated by the presence of guanine nucleotides and regulators of G protein activation (Aguayo and Pancetti, 1994; Aguayo et al., 1996; Tapia et al., 1997). Moreover, recent findings from our laboratory showed that $G\beta\gamma$ is a main factor for potentiation of the GlyR by low concentrations of ethanol (Yevenes et al., 2008).

Although there is not a well defined consensus sequence within the several proteins that interact with $G\beta\gamma$, the presence of basic amino acids (Arg, Lys) appears to be essential (Krapivinsky et al., 1998; Cantí et al., 1999). In the case of GlyRs, mutations in basic amino acids in the IL decreased both the interaction and modulation of $G\beta\gamma$ with GlyRs (Yevenes et al., 2006). Therefore, using biochemical, electrophysiological, and *in silico* techniques, we decided to examine the ability of several regions of the α_1 GlyR IL to directly interfere with $G\beta\gamma$ signaling. We identified a heptadecapeptide with the sequence of the N-terminal region of the IL that was able to inhibit the effects of $G\beta\gamma$ on two effectors, $GABA_{B1}$ activation of G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel (GIRK) and, more interestingly, the ethanol-induced potentiation of GlyRs.

Materials and Methods

Plasmids and Constructions. All the chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), and the molecular biology reagents were from New England Biolabs (Ipswich, MA) unless otherwise indicated. Expression vectors for $GABA_{B1}$ and $GABA_{B2}$ were provided by Dr. Andres Couve (University of Chile, Santiago, Chile). The GIRK1 plasmid was used as the template for glutathione *S*-transferase (GST) fusion protein construction using polymerase chain reaction products designed for the insertion in the pGEX-5 \times 3 vector (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The plasmid encoding β -adrenergic receptor kinase [β ARK; G protein-coupled receptor kinase (GRK2)], GIRK1, and GIRK4 were provided by Dr. Stephen Ikeda (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The heptadecapeptide RQH (RQHKELLR-FRRKRRHHK) and its scrambled analog RQHsc (REKHLRKHFRKHLRQR) were purchased from GenScript Corporation (Piscataway, NJ).

Molecular Modeling and Docking. The secondary structure of IL fragments was obtained from the SCRATCH web page (<http://www.igb.uci.edu/tools/scratch>) (Cheng et al., 2005), three-dimensionally modeled with Pymol (<http://pymol.sourceforge.net>), and energetically minimized in GROMACS (<http://www.gromacs.org/>) (Van Der Spoel et al., 2005) with a molecular dynamic of 1 ns in the Gromos96 43bl power field. The following fragments of the IL were used: N-terminal [(NTIL)-wild type (WT), from Arg309 to Lys392], C-terminal (CTIL-WT, from Arg382 to Arg392), and their mutant versions (NTIL-5A, 316-320A and CTIL-2A, 385-386A). For $G\beta\gamma$ (Protein Data Bank 1tbq), molecular docking was performed using ZDOCK software (<http://zlab.bu.edu/zdock/index.shtml>) in an angular step of 6° (Chen et al., 2003). Two thousand docking results were clustered into 10 groups using CLUSPRO server (<http://nrc.bu.edu/cluster/>) (Comeau et al., 2004). The structure of the complex representing the main cluster was minimized energetically with a molecular dynamic of 1 ns under the same conditions used for the fragments alone. The free energy calculation was determined with FastContact server (<http://structure.pitt.edu/servers/fastcontact/>) (Camacho and Zhang, 2005). The surface electrostatic potential was calculated with APBS software (<http://apbs.sourceforge.net/>) (Baker et al., 2001). All the

images were obtained with Pymol software. In the figures, blue and red represent regions of positive or negative electrostatic potential, respectively.

Construction of GST Fusion Proteins and GST Pull-Down Assays. DNA fragments encoding WT and mutant IL fragments, β ARK C terminus, and GIRK1 (amino acids 184–501) were subcloned in the vector pGEX-5 \times 3 (GE Healthcare). GST fusion proteins were expressed in *Escherichia coli* BL21 bacteria using 50 μ M isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. After 4 h, the cells were collected and sonicated in lysis buffer (phosphate buffer, 1% Triton X-100, protease inhibitor mixture II; Calbiochem, San Diego, CA). Subsequently, the proteins were purified using a glutathione resin (Novagen, Madison, WI). Normalized amounts of GST fusion protein were incubated with purified $G\beta\gamma$ protein (10 ng; Calbiochem). Incubations were done in 800 μ l of binding buffer (200 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.4, 0.1% Triton X-100, and protease inhibitor mixture II) at 4°C for 1 h. The beads were washed five times in binding buffer, and bound proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels. Bound $G\beta\gamma$ was detected using an anti- $G\beta$ antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) and a chemiluminescence kit (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA). The complete IL in fusion with GST and GST alone were used as positive and negative controls, respectively. Finally, the relative amount of $G\beta\gamma$ was quantified by densitometry. $G\beta$ detection on Western blots was considered direct evidence for $G\beta\gamma$ binding.

Electrophysiology. For experiments with GIRK channels, human embryonic kidney (HEK) 293 cells were cultured using standard methodologies and cotransfected with plasmids encoding the $GABA_{B1}$ receptor subunits $GABA_{B1}$ (fused to green fluorescent protein), $GABA_{B2}$, GIRK1, and GIRK4 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Expression of green fluorescent protein was used as a marker for positively transfected cells, and recordings were made after 18 to 24 h. Whole-cell recordings were performed using a holding potential of -60 mV. Patch electrodes were filled with 120 mM KCl, 10 mM 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, 10 mM HEPES, pH 7.4, 4 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, and 0.5 mM GTP with or without 200 μ M RQH peptide. The external solution contained 125 mM NaCl, 30.0 mM KCl, 3.0 mM $CaCl_2$, 1.0 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, pH 7.4, and 10 mM glucose. The amplitude of the potassium current was measured using a short pulse (4–5 s) of 10 μ M baclofen every 2 min during 16 min. A nonrelated peptide (EVHHQKL) was used as a control at the same concentration. We used this small peptide to bolster the capacity to access the intracellular milieu and to interact with $G\beta\gamma$. For the recording of ethanol-mediated potentiation on GlyRs, a previously described methodology was used (Yevenes et al., 2003, 2006). Ethanol was coapplied with glycine (15 μ M), and the results were expressed as percentage of potentiation at 15 min. Although ethanol effects on GlyRs are apparent with 10 mM (Aguayo et al., 1996; Yevenes et al., 2008), we decided to use 100 mM to increase the noise to signal ratio, facilitating the statistical analysis and comparison with previous work from our and other laboratories. A scrambled peptide with the same amino acid composition (previously described) was used as control.

Data Analysis. Statistical analyses were performed using analysis of variance, and the results are expressed as the arithmetic mean \pm S.E.M. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. Origin 7.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA) software was used for all the statistical analyses.

Results

Binding of $G\beta\gamma$ to IL Fragments. It has been previously established that the GlyR IL (between TM3 and TM4) plays an important role in channel modulation through its interactions with signal transduction proteins (Smart, 1997; Yevenes et al., 2006). For example, it was found that $GTP\gamma S$

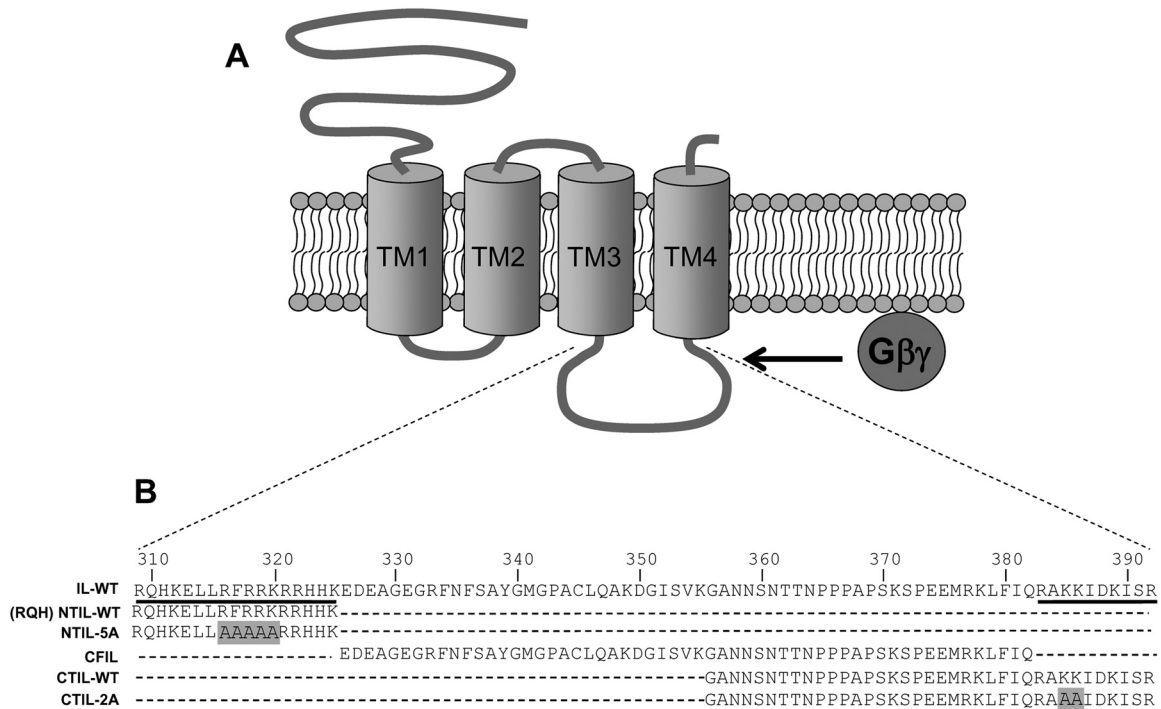


Fig. 1. Scheme of the GlyR topology and the sequences of recombinant fragments. A, schematic topology of the human $\alpha 1$ GlyR subunit. B, alignment of intracellular fragments used for GST pull-down assays and molecular docking. Underlined are the sequences used for molecular modeling and docking. IL-WT, full $\alpha 1$ IL; NTIL-WT, N-terminal (17 amino acids) region of IL; NTIL-5A, mutant version with alanine substitutions; CFIL, central fragment (326–381) of IL; CTIL-WT, C-terminal region of IL; CTIL-2A, mutant version. The sequence of NTIL-WT served as template for the RQH peptide.

enhances the glycinergic current and that this effect was blocked by the expression of $G\beta\gamma$ scavengers, such as $\epsilon\beta$ ARK (Pitcher et al., 1992). This result supports single-channel recordings that showed an increased open channel probability in the presence of $G\beta\gamma$ (Yevenes et al., 2003). A more recent study indicated that truncation of the central region of the IL (Glu326–Gln382) did not affect the regulation by $G\beta\gamma$ (Yevenes et al., 2006). However, mutations in the clusters of basic residues in the IL (Arg316 to Lys320, Lys385, and Lys 386) attenuated the potentiation caused by $G\beta\gamma$. Therefore, to examine the contributions of these two motifs in the interaction with $G\beta\gamma$, we constructed GST fusion proteins in wild and mutant forms and studied their ability to directly bind $G\beta\gamma$ using GST pull-down assays. Figure 1 shows a scheme with the different regions of the IL used for construction of GST fusion proteins.

Figure 2A illustrates purified fusion proteins that were visualized in a brilliant blue-stained SDS-acrylamide gel. The binding of $G\beta\gamma$ dimer to these proteins was subsequently analyzed with Western blot (Fig. 2B, see the experimental procedures for details). The data show that the NTIL is sufficient to display a significant $G\beta\gamma$ dimer binding ($78 \pm 5\%$ of control) and that this binding was strongly diminished ($21 \pm 12\%$) by mutating the positive residue cluster (from position 316 to 320) to alanine. Moreover, the data show that $G\beta\gamma$ was unable to bind the central fragment of the IL (Fig. 2, B and C). These results support previous studies showing that direct binding of $G\beta\gamma$ to the GlyR and its subsequent channel modulation were diminished by mutations in basic residues (Yevenes et al., 2006). On the other hand, the C-terminal region (CTIL-WT) in fusion with GST did not present a significant binding to $G\beta\gamma$ in the pull-down assays

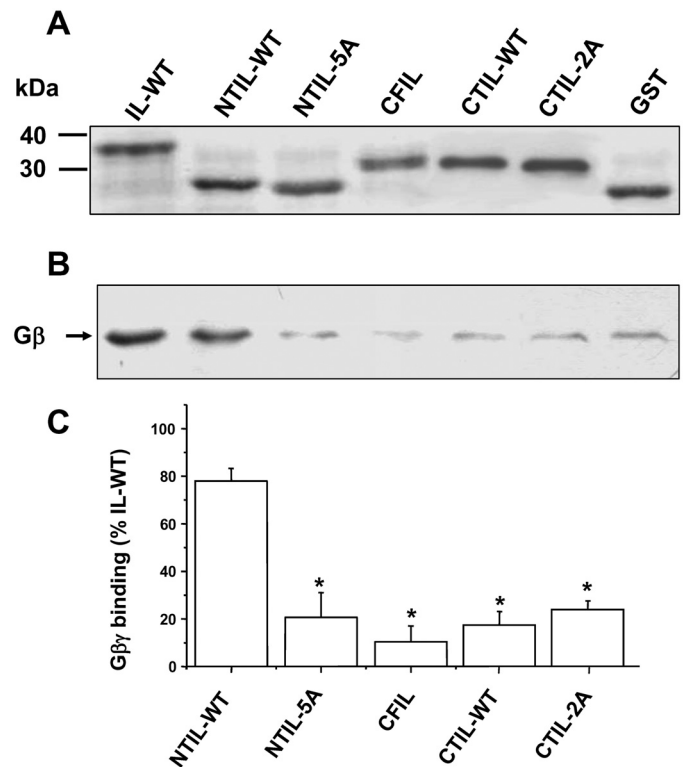


Fig. 2. Binding of $G\beta\gamma$ to different GlyR IL regions. A, brilliant blue staining of purified GST fusion proteins. B, binding of $G\beta\gamma$ to IL-WT and fragments detected as Western blots from GST pull-down experiments. C, quantification of $G\beta\gamma$ binding to different intracellular fragments. The bars represent the mean \pm S.E.M. obtained from at least three different experiments. The level of $G\beta\gamma$ binding to NTIL-WT was significantly different (*, $P < 0.05$).

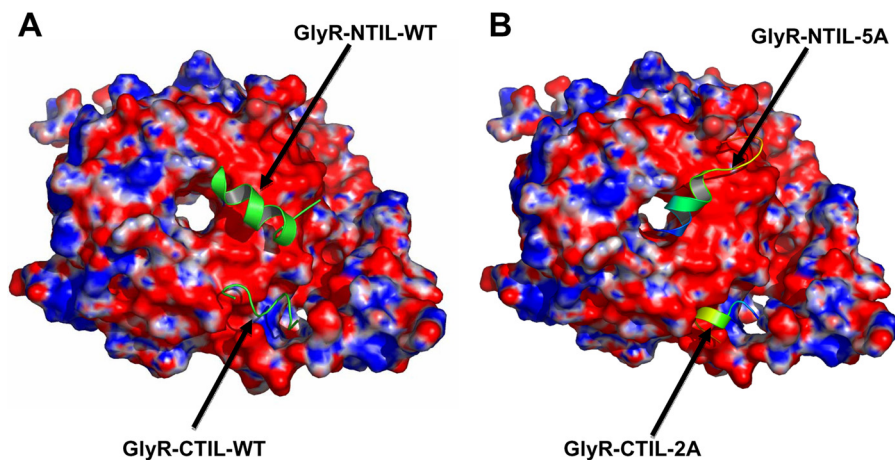


Fig. 3. Molecular docking of N- and C-terminal fragments to G $\beta\gamma$. Molecular docking was performed using crystallographic three-dimensional data of G $\beta\gamma$ (blue and red represent regions of positive and negative electrostatic potential, respectively) as described under *Materials and Methods*. A, WT N- and C-terminal fragments (Arg309–Lys325 and Arg382–Arg392) interact with high ΔG binding in different regions on the highly electronegative surface of G $\beta\gamma$. B, mutant N- and C-terminal fragments [316–320A (5A) and 385–386A (2A)] interact with G $\beta\gamma$ with a reduced ΔG binding (see text).

(Fig. 2C). In a previous study, using the entire loop, we reported that this region contributed to G $\beta\gamma$ binding (Yevenes et al., 2006). With these *in vitro* results, it was evident that the N-terminal region was comparatively more important for G $\beta\gamma$ binding than the central or the C-terminal regions of the IL.

We then used computational modeling to obtain theoretical information about the contribution of these two GlyR IL regions (Fig. 1) for the binding of G $\beta\gamma$ (Fig. 3). According to secondary structure prediction, both IL regions were modeled as α helices. By using this technique, we found that both fragments fit in nearby regions of the G $\beta\gamma$ dimer, within an area of G $\beta\gamma$ that has a high density of amino acids with an electronegative character (as shown in red). The values for ΔG calculated in the *in silico* analysis showed that the N-terminal region of the IL binds to G $\beta\gamma$ with a higher strength than the C-terminal region, with values of -20.63 and -12.15 kcal/mol, respectively. In addition, the docking studies with the alanine-substituted IL fragments to G $\beta\gamma$ showed large reductions in ΔG values (-1.44 and -12.00 kcal/mol for N- and C-terminal regions, respectively). These results support the conclusion that the N-terminal region is very rele-

vant for G $\beta\gamma$ binding, and it could be an area of choice for the design of a G $\beta\gamma$ -blocking peptide.

Peptide Derived from the GlyR IL N-Terminal Region Sequence Interfered with G $\beta\gamma$ Binding to Several Effectors. We synthesized a small peptide, referred to as RQH (see Fig. 1), to test its capacity to interfere with the binding of the IL to G $\beta\gamma$ and with activation of some effectors. Micromolar concentrations (0.2 and 2 μ M) of this peptide were able to inhibit the binding of G $\beta\gamma$ to the whole IL of the GlyR in GST pull-down assays to 74 ± 4 and $57 \pm 5\%$, respectively, compared with control (Fig. 4A). No higher level of binding inhibition was found with 20 μ M RQH. However, showing the specificity of the peptide inhibition, we found that the same concentrations of the scramble peptide were unable to alter the binding of G $\beta\gamma$ to the IL (Fig. 4A). Moreover, the RQH peptide was able to interfere with the binding of G $\beta\gamma$ to two other effectors coupled to GST, such as GST-ct- β ARK and GST-GIRK₁₃₈. Comparison of the predicted binding position of RQH in G $\beta\gamma$ crystal structure indicated that the regions for binding of RQH, β ARK, and GIRK1 are partly overlapped (Fig. 5). These data are in agreement with previous crystallographic studies of G $\beta\gamma$ in complex with

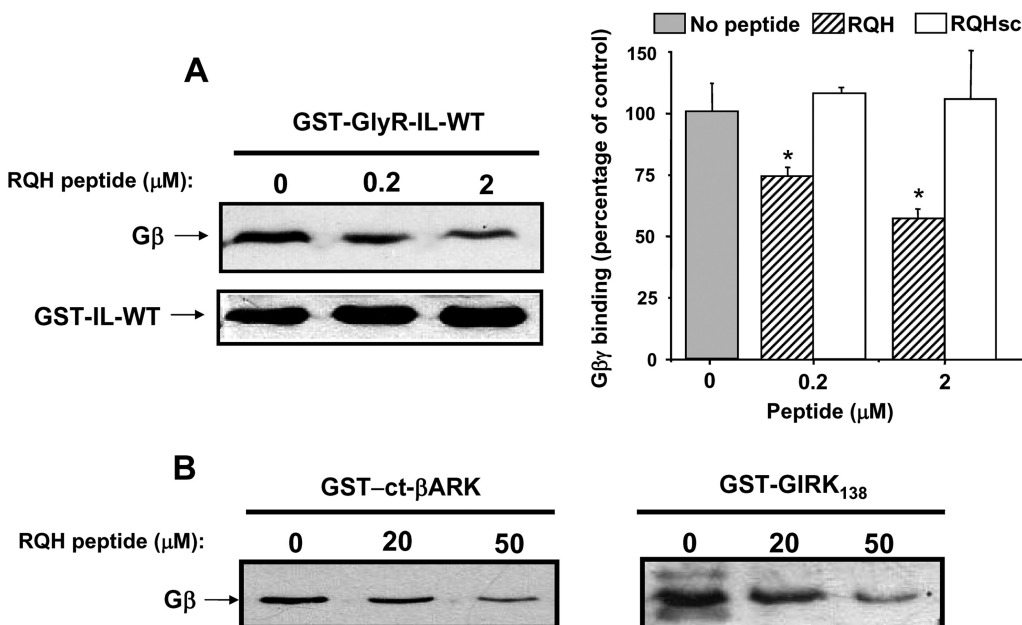


Fig. 4. RQH reduced G $\beta\gamma$ binding to GlyR and other dimer effectors. A, binding of G $\beta\gamma$ to the full IL (GST-IL-WT) was reduced by RQH. The graph shows the quantification of G $\beta\gamma$ binding to GST-IL-WT in the presence of RQH (dashed bars) or a scrambled peptide (RQHsc, white bars). Data are from four different GST pull-down experiments that were quantified and plotted as percentage of control condition, without any peptide (gray bar) (*, $P < 0.05$ compared with control). B, reduction of G $\beta\gamma$ binding to ct- β ARK and GIRK1₁₃₈ by RQH at the shown micromolar concentrations. Similar results were obtained in three different experiments.

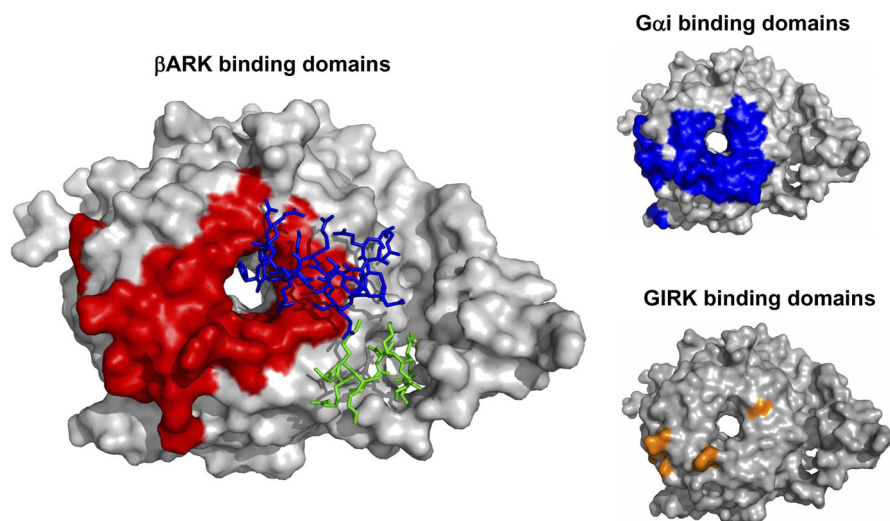


Fig. 5. GlyR-IL shares binding domains with other effectors in $G\beta\gamma$. The model shows $G\beta\gamma$ binding domains for β ARK, $G\alpha_i$, and GIRK (red, blue, and yellow, respectively). These regions partly overlap those of the N- and C-terminal in the GlyR IL (blue and green, respectively). The structural data for $G\beta\gamma$, ct- β ARK, and $G\alpha_i$ were indicated under *Materials and Methods*. The GIRK binding domains were taken from mutational studies (Ford et al., 1998).

ct- β ARK and $G\alpha_i$, as well as mutational analysis of GIRK (Ford et al., 1998; Li et al., 1998). A similar conclusion was reached comparing regions of binding for GIRK1 (Ford et al., 1998) and the RQH peptide on $G\beta\gamma$ (Fig. 5).

RQH Blocks $G\beta\gamma$ -Mediated Activation of GIRK and Ethanol Potentiation of GlyR Channels. Based on the results obtained with RQH, we wanted to find out whether this peptide could interfere with the $G\beta\gamma$ -mediated modulation of two different cellular effectors. Therefore, we added this short peptide in the intracellular solution using the patch-clamp technique and tested two $G\beta\gamma$ -mediated effects. First, HEK cells were cotransfected with the $GABA_B$ receptor and $GIRK_{1-4}$ to assemble a K^+ -permeable ion channel (Jones et al., 1998; Kaupmann et al., 1998; White et al., 1998). Under these conditions, the stimulation of $GABA_B$ receptors with 10 μ M baclofen induced a K^+ current that was well sustained in time. It is interesting to note that intracellular dialysis with RQH (200 μ M) in the patch pipette significantly inhibited the potassium current activated by $G\beta\gamma$ to $24 \pm 14\%$ of the control response (Fig. 6). On the other hand, neither a scrambled peptide (RQHsc) nor a nonrelated peptide affected the baclofen-activated K^+ current. Second, it was previously reported that GlyR potentiation by ethanol was dependent on the state of activation of the G protein (Aguayo et al., 1996; Yevenes et al., 2008). Therefore, we

tested the sensitivity of the $\alpha 1$ GlyR subunit to ethanol in the presence of the peptide in the intracellular solution. For this, the glycine-induced current was measured with and without ethanol perfusion after 10 min of RQH peptide intracellular dialysis. The data showed that HEK cells expressing GlyRs were potentiated with ethanol by $51 \pm 10\%$ over control, and that this enhancement was significantly inhibited by RQH (Fig. 7, A and C). The ethanol-induced potentiation of GlyRs was not altered when the cells were dialyzed with the scrambled peptide (RQHsc). Likewise, although the receptor became insensitive to ethanol, the current properties, such as amplitude and time course, were unchanged by 10 min of dialysis with RQH indicating that the peptide had no effects on basal GlyR function (Fig. 7, A and B).

Discussion

$G\beta\gamma$ dimer release after heterotrimeric G protein activation can control diverse physiological processes, such as heart rate, hormonal and neurotransmitter release, neuronal excitability, and cell migration. These actions are mediated by the direct interaction between $G\beta\gamma$ and its effectors that range from membrane channels that control excitability to soluble enzymes that have metabolic or signaling functions (Clapham and Neer, 1997; Hamm, 1998). In an effort to

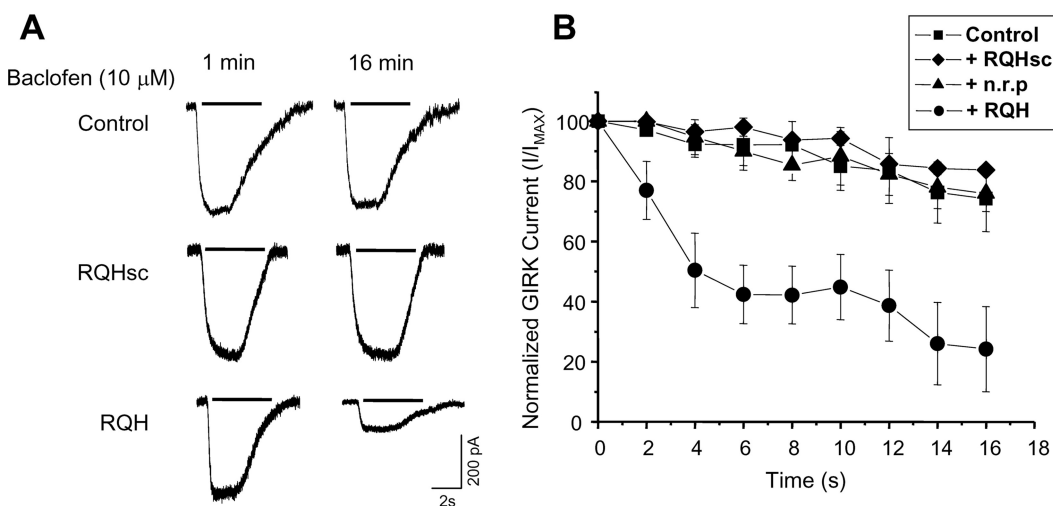


Fig. 6. RQH peptide interferes with $G\beta\gamma$ -mediated activation of GIRK. A, data show the effect of RQH on activation of GIRK (GIRK1 and GIRK4) by $GABA_B$ receptors (R1 and R2) in HEK 293 cells. The baclofen-induced K^+ current was inhibited by intracellular application of RQH, but not the scrambled peptide, in the patch pipette. B, time course of baclofen-stimulated K^+ current in the absence (squares) and presence of RQH (circles), RQHsc (diamonds), and a nonrelated peptide (triangles). All the peptides were used at a concentration of 200 μ M. The symbols represent the mean \pm S.E.M. from more than six cells.

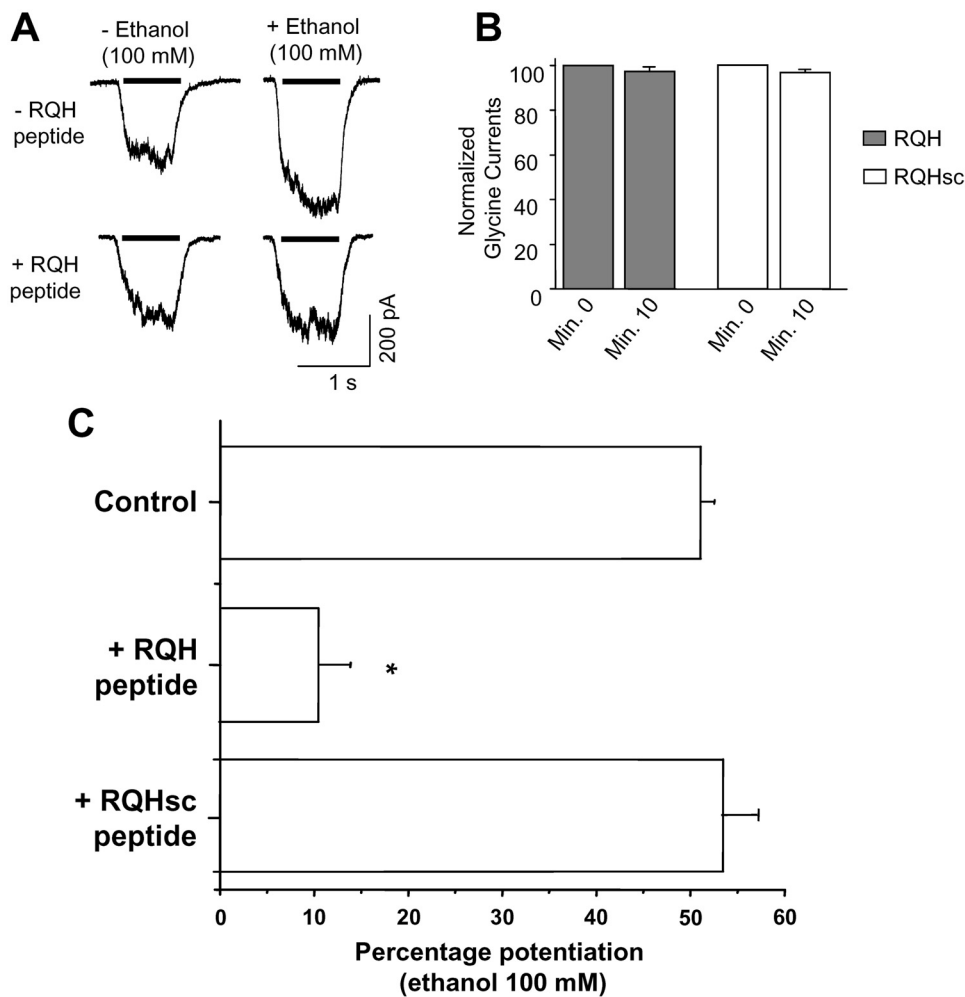


Fig. 7. RQH interferes with the ethanol-induced potentiation of the GlyR. **A**, the current traces were evoked activating $\alpha 1$ containing GlyRs with $15 \mu\text{M}$ glycine in the absence and presence of ethanol (100 mM). The lower traces were recorded after 10 min of intracellular dialysis with RQH peptide ($200 \mu\text{M}$) in the patch pipette. **B**, graph shows the normalized glycine current amplitude after 10 min of intracellular dialysis with either RQH or RQHsc peptides. **C**, graph summarizes the percentage potentiation elicited by 100 mM ethanol in the absence and presence of RQH or scrambled peptides (RQHsc) intracellularly applied for 10 min. The symbols represent the mean \pm S.E.M. from at least six cells. *, represents a difference from control, $P < 0.05$.

identify sequences useful to interfere with $G\beta\gamma$ -mediated signaling, the QEHA peptide (from adenylyl cyclase 2) was generated (Chen et al., 1995). However, it was found that several $G\beta\gamma$ effectors lack this type of motif, making its use limited (Touhara et al., 1995; Barr et al., 2000; Davis et al., 2005). Even in the absence of a defined molecular motif for $G\beta\gamma$ binding, several studies have shown that basic amino acids have important roles on binding and modulation of effectors, such as βARK , GIRK, voltage-dependent calcium channels, and phospholipase C (Koch et al., 1993; Touhara et al., 1994; Krapivinsky et al., 1998; Cantí et al., 1999; Barr et al., 2000). More recently, it has been shown that the GlyR contains two basic motifs in its IL that are responsible for $G\beta\gamma$ modulation (Yevenes et al., 2003, 2006). In the present study, we examined these motifs using three approaches: 1) in vitro binding studies with GST pull down, 2) modeling/docking in silico calculations, and 3) functional assays of $G\beta\gamma$ -modulated ion channels to obtain a sequence for the design of a small peptide with the capacity to block the action of $G\beta\gamma$. In agreement with other previous studies, we found that the N-terminal motif of the IL exerted an important role for $G\beta\gamma$ binding. The central region, on the other hand, was unable to bind $G\beta\gamma$, which agrees with functional studies (Yevenes et al., 2006). Surprisingly, we did not detect significant $G\beta\gamma$ binding to the C-terminal region, a finding which contrasts with a proposed role of this motif in functional modulation (Yevenes et al., 2006). However, it is possible

that expression of the fusion protein altered the secondary structure of the C-terminal region. These results were well supported by the docking analyses that revealed a higher ΔG for binding of the N-terminal region compared with the C-terminal region of the GlyR IL and confirmed previous results (Yevenes et al., 2006), indicating that the N-terminal region is very important for the direct binding of $G\beta\gamma$. The C-terminal motif, on the other hand, presents a smaller $G\beta\gamma$ binding capacity, but it might be important for the conformational changes controlling channel gating (Yevenes et al., 2008).

Based on these results and to try to interfere with $G\beta\gamma$ -mediated modulation, we designed a mini-peptide with the first 17 amino acids of the IL (RQH peptide). As expected, the peptide produced an inhibition of the binding of $G\beta\gamma$ to the entire IL of GlyR using an in vitro interaction assay. In addition, we found that the binding of ct- βARK and GIRK1 to $G\beta\gamma$ in the GST assay was also reduced by the peptide, in agreement with the existence of somewhat overlapping regions with distinct effectors (Ford et al., 1998). Finally, functional assays showed that the RQH peptide affected two $G\beta\gamma$ -linked responses: activation of GIRK by GABA_B receptor and potentiation of $\alpha 1$ GlyR by ethanol (Kaupmann et al., 1998; Yevenes et al., 2003). The data support the conclusion that these inhibitions were produced by binding of the RQH peptide to effector recognition regions in $G\beta\gamma$. Accordingly, the RQH peptide appears to behave as a scavenger as we

showed that it can interact and block the effects of G $\beta\gamma$ in two effectors (GlyR and GIRK). RQH did not have any apparent effects on GlyR properties and function, suggesting that previous release of G $\beta\gamma$ is necessary to exert its blocking action. Furthermore, although the data cannot exclude the possibility that RQH affects the binding of G $\beta\gamma$ to G α subunits, we believe that it is unlikely that it would activate G proteins and subsequently block the G $\beta\gamma$ dimer. In conclusion, the newly identified RQH was able to inhibit the binding of several effectors to G $\beta\gamma$ and ethanol potentiation, without noticeable changes on the properties of the GlyR or general cell function, opening new possibilities to design small molecules that interfere with signal transduction.

In relevance to alcohol abuse, it is now accepted that GlyRs are a major target for the intoxicating effects of ethanol as suggested by previous studies from our and other groups (Aguayo et al., 1996; Findlay et al., 2002; Molander et al., 2005, 2007). Therefore, the present results are relevant because we show that a small heptadecapeptide can antagonize the alcohol effect on an LGIC, opening new possibilities for the study of small organic molecules that can interfere with the intoxicating effect of ethanol, which supports previous work in relation to the development of compounds that can affect G protein activity (Davis et al., 2005; Bonacci et al., 2006).

Acknowledgments

We thank Laurie Aguayo for technical assistance in molecular biology and text editing and Pablo Lara for helping with some preliminary experiments.

References

- Aguayo LG and Pancetti FC (1994) Ethanol modulation of the gamma-aminobutyric acid- and glycine-activated Cl⁻ current in cultured mouse neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **270**:61–69.
- Aguayo LG, Tapia JC, and Pancetti FC (1996) Potentiation of the glycine-activated Cl⁻ current by ethanol in cultured mouse spinal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **279**:1116–1122.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, and McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:10037–10041.
- Barr AJ, Ali H, Haribabu B, Snyderman R, and Smrcka AV (2000) Identification of a region at the N-terminus of phospholipase C-beta 3 that interacts with G protein beta gamma subunits. *Biochemistry* **39**:1800–1806.
- Bonacci TM, Mathews JL, Yuan C, Lehmann DM, Malik S, Wu D, Font JL, Bidlack JM, and Smrcka AV (2006) Differential targeting of Gbetagamma-subunit signaling with small molecules. *Science* **312**:443–446.
- Camacho CJ and Zhang C (2005) FastContact: rapid estimate of contact and binding free energies. *Bioinformatics* **21**:2534–2536.
- Canti C, Page KM, Stephens GJ, and Dolphin AC (1999) Identification of residues in the N terminus of alpha1B critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by Gbeta gamma. *J Neurosci* **19**:6855–6864.
- Chen J, DeVivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, Carty DJ, Blank JL, Exton JH, and Stoffel RH (1995) A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science* **268**:1166–1169.
- Chen R, Li L, and Weng Z (2003) ZDOCK: an initial-stage protein-docking algorithm. *Proteins* **52**:80–87.
- Cheng J, Randall AZ, Sweredoski MJ, and Baldi P (2005) SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res* **33**:W72–W76.
- Clapham DE and Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:167–203.
- Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, and Camacho CJ (2004) ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics* **20**:45–50.
- Davis TL, Bonacci TM, Sprang SR, and Smrcka AV (2005) Structural and molecular characterization of a preferred protein interaction surface on G protein beta gamma subunits. *Biochemistry* **44**:10593–10604.
- Findlay GS, Wick MJ, Mascia MP, Wallace D, Miller GW, Harris RA, and Blednov YA (2002) Transgenic expression of a mutant glycine receptor decreases alcohol sensitivity of mice. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:526–534.
- Fischer H, Liu DM, Lee A, Harries JC, and Adams DJ (2005) Selective modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channel subunits by Go-protein subunits. *J Neurosci* **25**:3571–3577.
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, et al. (1998) Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* **280**:1271–1274.
- Hamm HE (1998) The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* **273**:669–672.
- Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao WJ, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang LY, et al. (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* **396**:674–679.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, et al. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**:683–687.
- Koch WJ, Inglese J, Stone WC, and Lefkowitz RJ (1993) The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* **268**:8256–8260.
- Krapivinsky G, Kennedy ME, Nemej J, Medina I, Krapivinsky L, and Clapham DE (1998) Gbeta binding to GIRK4 subunit is critical for G protein-gated K⁺ channel activation. *J Biol Chem* **273**:16946–16952.
- Laube B, Kuhse J, Rundström N, Kirsch J, Schmieden V, and Betz H (1995) Modulation by zinc ions of native rat and recombinant human inhibitory glycine receptors. *J Physiol* **483**:613–619.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* **58**:760–793.
- Li Y, Sternweis PM, Charnecki S, Smith TF, Gilman AG, Neer EJ, and Kozasa T (1998) Sites for Galpha binding on the G protein beta subunit overlap with sites for regulation of phospholipase Cbeta and adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **273**:16265–16272.
- Molander A, Lidö HH, Löf E, Ericson M, and Söderpalm B (2007) The glycine reuptake inhibitor Org 25935 decreases ethanol intake and preference in male Wistar rats. *Alcohol Alcohol* **42**:11–18.
- Molander A, Löf E, Stomberg R, Ericson M, and Söderpalm B (2005) Involvement of accumbal glycine receptors in the regulation of voluntary ethanol intake in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* **29**:38–45.
- Moss SJ and Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* **2**:240–250.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* **257**:1264–1267.
- Prince RJ and Simmonds MA (1992) Steroid modulation of the strychnine-sensitive glycine receptor. *Neuropharmacology* **31**:201–205.
- Smart TG (1997) Regulation of excitatory and inhibitory neurotransmitter-gated ion channels by protein phosphorylation. *Curr Opin Neurobiol* **7**:358–367.
- Tapia JC, Espinoza F, and Aguayo LG (1997) Differential intracellular regulation of cortical GABA(A) and spinal glycine receptors in cultured neurons. *Brain Res* **769**:203–210.
- Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Shaw G, and Lefkowitz RJ (1994) Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* **269**:10217–10220.
- Touhara K, Koch WJ, Hawes BE, and Lefkowitz RJ (1995) Mutational analysis of the pleckstrin homology domain of the beta-adrenergic receptor kinase. Differential effects on G beta gamma and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding. *J Biol Chem* **270**:17000–17005.
- Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, and Berendsen HJ (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* **26**:1701–1718.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, and Marshall FH (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* **396**:679–682.
- Wu FS, Chen SC, and Tsai JJ (1997) Competitive inhibition of the glycine-induced current by pregnenolone sulfate in cultured chick spinal cord neurons. *Brain Res* **750**:318–320.
- Yevenes GE, Moraga-Cid G, Guzmán L, Haeger S, Oliveira L, Olate J, Schmalzing G, and Aguayo LG (2006) Molecular determinants for G protein betagamma modulation of ionotropic glycine receptors. *J Biol Chem* **281**:39300–39307.
- Yevenes GE, Moraga-Cid G, Peoples RW, Schmalzing G, and Aguayo LG (2008) A selective G $\beta\gamma$ -linked intracellular mechanism for modulation of a ligand-gated ion channel by ethanol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:20523–20528.
- Yevenes GE, Peoples RW, Tapia JC, Parodi J, Soto X, Olate J, and Aguayo LG (2003) Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits. *Nat Neurosci* **6**:819–824.
- Young AB and Snyder SH (1974) The glycine synaptic receptor: evidence that strychnine binding is associated with the ionic conductance mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:4002–4005.

Address correspondence to: Luis G. Aguayo, Department of Physiology, University of Concepción, P.O. Box 160-C, Concepción, Chile. E-mail: laguayo@udec.cl

A Semiempirical Approach to the Intra-Phycocyanin and Inter-Phycocyanin Fluorescence Resonance Energy-Transfer Pathways in Phycobilisomes

ADELIO R. MATAMALA,¹ DANIEL E. ALMONACID,^{1*} MAXIMILIANO F. FIGUEROA,²
JOSÉ MARTÍNEZ-OYANEDEL,² MARTA C. BUNSTER²

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Edmundo Larenas 129, Concepción, Chile

²Laboratorio de Biofísica Molecular, Grupo de Biología Estructural, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

Received 18 July 2006; Revised 20 October 2006; Accepted 23 October 2006

DOI 10.1002/jcc.20628

Published online 13 February 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Abstract: A semiempirical methodology to model the intra-phycoyanin and inter-phycoyanin fluorescence resonance energy-transfer (FRET) pathways in the rods of the phycobilisomes (PBSs) from *Fremyella diplosiphon* is presented. Using the Förster formulation of FRET and combining experimental data and PM3 calculation of the dipole moments of the aromatic portions of the chromophores, transfer constants between pairs of chromophores in the phycocyanin (PC) structure were obtained. Protein docking of two PC hexamers was used to predict the optimal distance and axial rotation angle for the stacked PCs in the PBSs' rods. Using the distance obtained by the docking process, transfer constants between pairs of chromophores belonging to different PC hexamers were calculated as a function of the angle of rotation. We show that six preferential FRET pathways within the PC hexameric ring and 15 pathways between hexamers exist, with transfer constants consistent with experimental results. Protein docking predicted the quaternary structure for PCs in rods with inter-phycoyanin distance of 55.6 Å and rotation angle of 20.5°. The inter-phycoyanin FRET constant between chromophores at positions β_{155} is maximized at the rotation angle predicted by docking revealing the crucial role of this specific inter-phycoyanin channel in defining the complete set of FRET pathways in the system.

© 2007 Wiley Periodicals, Inc. J Comput Chem 28: 1200–1207, 2007

Key words: semiempirical; dipole moment; FRET; phycocyanin; protein docking

Introduction

Cyanobacteria and eukaryotic red algae contain elaborate light harvesting antenna complexes in addition to chlorophyll molecules. These antenna systems absorb the incident sunlight in portions of the visible spectrum poorly utilized by chlorophyll and convey the energy to the photosynthetic reaction centers through a fluorescence resonance energy-transfer (FRET) mechanism.^{1–6} Each antenna system is made up of chromophore-containing proteins called phycobiliproteins (PBP). The PBPs are arranged in subcellular structures called phycobilisomes (PBSs) at the surface of the thylakoid membranes.^{7,8} The PBSs allow the chromophores to adopt an appropriate geometry for the capture of light and the transfer of energy with an impressively high efficiency.^{9,10} PBSs from different species differ in their polypeptide composition. However, they share a general common morphology that consists of a core of face-to-face cylinders formed

by stacked trimeric discs of PBPs and several rods that radiate from the core, composed of back-to-back stacked hexameric discs of PBPs.^{11,12} Each PBP consists of α and β polypeptide subunits to which one or more linear tetrapyrrole chromophores are covalently attached. These α and β subunits associate to form $\alpha\beta$ monomers and six of these monomers form the $(\alpha\beta)_6$ hexameric units, which pile up to form the PBS rods. Phycocyanin (PC) is one of the PBPs that is present in the rods of the PBSs. The chromophore in PC, phycocyanobilin, is attached by

*Present address: Unilever Centre for Molecular Science Informatics, Department of Chemistry, University of Cambridge, Lensfield Road, Cambridge, CB2 1EW, UK.

Correspondence to: A. R. Matamala; e-mail: amatala@udec.cl

Contract/grant sponsor: Universidad de Concepción (Chile); contract/grant numbers: DIUC 205.037.002

cysteinyli thioether linkages at positions α_{84} , β_{84} , and β_{155} in the α and β subunits.

The supramolecular structures of PBSs have been determined for many organisms including *Synechocystis*,^{13,14} *Synechococcus*,^{15–18} and *Anabaena*.^{11,19} However, the study of light transfer in PBSs remains a challenging task from both an experimental and theoretical point of view. Since the first three-dimensional high resolution structure of a PC was reported,²⁰ considerable efforts have been devoted to modeling the energy-transfer processes among chromophores within and between $(\alpha\beta)_6$ hexameric rings.^{21–26} Förster^{2–4} introduced a very basic formulation for the energy-transfer mechanism between two chromophores, the so-called FRET mechanism. A fluorescent molecule (the donor) is excited, after which its energy is nonradiatively transferred to a second molecule (the acceptor), which becomes excited while the donor molecule returns to the electronic ground state. This process occurs under resonance conditions, i.e., under conservation of the total energy. Part of the electronic energy may be transformed into vibrational energy resulting in small inefficiencies due to thermal dissipation. The original theory of FRET was derived under strong assumptions: long-range dipole–dipole transfer regime and single-chromophore interactions. Dexter²⁷ improved the formulation of FRET to include higher multipole and exchange interactions. Recent experimental and theoretical developments have suggested the necessity of a theory of FRET considering multichromophoric processes.^{28–32} However, the original Förster’s formulation of FRET has been confirmed to be an excellent approximation to model the light transfer processes occurring in PBPs.^{33–34}

In his formulation, Förster^{2–4} defined an energy-transfer constant characterized by the spectroscopic properties and the interaction geometry of the participating chromophores. The latter is known as the geometric factor and includes the distance between the centers of mass for each pair of chromophores and the dipole–dipole orientation coefficient and is the most influential term in the Förster equation.³⁵ Distances between chromophores can be extracted easily from high resolution structures of PBPs, however dipole–dipole orientation coefficients need the determination of the direction of the dipole moment of the chromophores. To obtain the direction of the dipole moments, Schirmer and colleagues, as a first approximation, fitted a line to the conjugated part of the chromophores by least squares methods.³⁶ A more advanced determination of the dipole moment of chromophores in PC has been carried out by Scharnagl and Schneider.³⁵ They used the PPP method and considered the whole chromophores and their surrounding amino acid residues as a “super molecule” and concluded that the direction of the dipole moments is essentially parallel to the long axis of the chromophores. Despite FRET formulation being strongly dependant on the dipole moments of the interacting chromophores, all studies of FRET in PBSs up to this date have been carried out using dipole moments determined as fitted lines to either the conjugated part or the long axis of the chromophores, approximations that are not well justified.

Here, we present a semiempirical methodology to determine the direction of the dipole moment of the chromophores in PC and model the intra-PC and inter-PC FRET pathways in the PBSs from *Fremyella diplosiphon*.²¹ In section one, we present

PM3 semiempirical dipole moments for the chromophores in PC and use Förster’s formulation of FRET to determine intra-phyco-cyanin preferential light transfer pathways. In section two, a protein docking of two PC hexamers is presented to determine the optimal distance and axial rotation angle for the stacked PCs in the PBSs’ rods. In section three, using the distance determined by docking, inter-phyco-cyanin FRET pathways were studied as a function of the inter-phyco-cyanin rotation angle.

Methods

According to the Förster formulation of FRET,^{2–4,33} the frequency of energy transfer events between a donor–acceptor pair of chromophores is defined by the so-called transfer rate constant, K_{DA} , given by:

$$K_{DA} = CGSI \quad (1)$$

where C is a collection of constants, G is the geometric factor, S includes the spectroscopic properties of the interacting chromophores, and I is the overlap integral between the emission and absorption fluorescence spectra of the donor and acceptor chromophores, respectively.

In eq. (1), the constant C includes the Avogadro number, N_A , and the refractive index of the surrounding medium, n ,

$$C = \frac{9 \ln 10}{128\pi^5 N_A n^4} \quad (2)$$

The geometric factor G ,

$$G = \frac{\kappa_{DA}^2}{R_{DA}^6}, \quad (3)$$

includes the distance between the centers of mass for each pair of chromophores, R_{DA} , and the dipole–dipole orientation coefficient:

$$\kappa_{DA} = \hat{\mu}_D \hat{\mu}_A - 3(\hat{\mu}_D \hat{r}_{DA})(\hat{\mu}_A \hat{r}_{DA}), \quad (4)$$

where $\hat{\mu}_D$ and $\hat{\mu}_A$ are unit vectors in the direction of the dipole of the donor and acceptor chromophores, respectively, and \hat{r}_{DA} is the unit vector along the line that passes through both donor and acceptor centers of mass. The term S is given by:

$$S = \frac{\Phi_D}{\tau_D} \varepsilon_A, \quad (5)$$

where Φ_D and τ_D are the quantum efficiency and the life-time of the fluorescence process of the donor chromophore, respectively, and ε_A is the molar extinction coefficient of the acceptor chromophore. Finally, the term I is given by the following integral:

$$I = \int_0^\infty F_D(\lambda) A_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (6)$$

where $F_D(\lambda)$ and $A_A(\lambda)$ are the normalized fluorescence spectrum of the donor and absorption spectrum of the acceptor chromophores, respectively.

The atomic coordinates of the constitutive phycocyanin (PC) from *Fremyella diplosiphon* were extracted under accession code 1 cpc from the Protein Data Bank. This structure was

Table 1. Quantum Efficiency, Φ , Fluorescence Life time, τ , and Molar Extinction Coefficient, ϵ , for the Chromophores.

Chromophore	Φ	τ (ns)	$\epsilon \times 10^{-8}$ ($\text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$)
α_{84}	0.23	1.50	1.15
β_{84}	0.19	1.45	0.70
β_{155}	0.25	0.93	1.12

Data were taken from ref. 33.

obtained by Duerring et al.²¹ from X-ray data with an R-factor of 18.1% and resolution of 1.66 Å. Each unit cell consists of two $\alpha\beta$ heterodimers, which each contain three tetrapyrrole chromophores (phycocyanobilins) at positions α_{84} , β_{84} , and β_{155} . The $(\alpha\beta)_6$ hexameric ring (containing 18 chromophore molecules) was obtained by the application of the R3-symmetry generator. The labeling of the subunits is in accordance with the symmetry operation as suggested in ref. 36.

The dipole moment of the aromatic portion of each chromophore was calculated as a single point for their conformation in the PC hexamer using the PM3 semiempirical method³⁷ implemented in Gaussian 98.³⁸ The correct hybridization of the atoms in the aromatic portions was maintained by substituting the connected non-hydrogen atoms with hydrogen. The distance between the centers of mass for each pair of chromophores was calculated after transforming the atomic coordinates from the standard system of reference (Gaussian output) to the actual coordinates in the PC structure.

Values for the parameters contained in the S and I terms were taken from ref. 33 and are shown in Tables 1 and 2. These are experimental values for the chromophores in PC from *Synechococcus* sp. *PCC 7002* and are assumed to be valid for the set of chromophores in PC from *Fremyella diplosiphon* studied in the present work based on the structural similarity of the chromophores.²¹ In addition, both PCs share the same residues that modulate the spectral properties of the chromophores through Coulombic and van der Waals' interactions.^{21,39} The refractive index, n , was set to the value 1.567 on the basis of experimental results.^{40,41}

To define the geometrical arrangement adopted by the stacked PCs in the rods of physiological phycobilisomes (PBSs), two PC hexamers were docked using the program BiGGER^{42,43}

Table 2. Fluorescence Overlap Integral, I , Between Donor–Acceptor Pair of Chromophores.

Donor	Acceptor		
	α_{84}	β_{84}	β_{155}
α_{84}	4.50	7.49	2.16
β_{84}	3.47	6.96	1.25
β_{155}	7.81	9.97	5.60

Data were taken from ref. 33.

with an angular step of 15°. The 5000 models generated are presented ranked according to five different parameters: geometric complementarity, side chain contacts, electrostatic energy, solvation energy, and global score. The latter is a value defined by BiGGER that combines the former four parameters to indicate the likeliness of a model to represent a near-native solution and it ranges from 0 to 1. To have a representative sample of the best putative models, the 20 top scored models for each of the five interaction parameters calculated by the software were selected. Each of the selected models was then visually inspected to determine whether they did or did not show the back-to-back type of interaction reported for PCs in rods as seen by electronic microscopy,^{11,18,44} i.e., PC hexamers positioned one on top of another maintaining an axial symmetry. Displacement along the symmetry axis passing through both centers of the PC rings and rotations around the same axis were considered to cluster the putative models. The inter-phycocyanin distance of the models in the best scored cluster was then used for investigating inter-phycocyanin FRET constants as a function of the angle of rotation. Because of the threefold symmetry of the system, a rotation range of 120° was studied.

In this work, to describe energy transfer between chromophores, we use the term pathway. This term refers to single or multiple consecutive steps of energy transfer between pair of chromophores where the Förster constants are the highest for the system. Preferential pathways refer to those pathways that are compatible with empirical information and also with a global model for energy transfer.

Results and Discussions

Intra-Phycocyanin Preferential Light Transfer Pathways

Table 3 shows the mass centers and PM3 dipole moments obtained for the aromatic portions of the phycocyanobilins in the unit cell of PC from *Fremyella diplosiphon*. Using the data in Tables 1–3, FRET constants were determined for all possible acceptor–donor pairs within a hexamer of PC. Light transfer between chromophores α_{84}^4 – β_{84}^6 (and their symmetry equivalents α_{84}^5 – β_{84}^4 and α_{84}^6 – β_{84}^5) are the fastest, taking 5.96 ps on average. These are followed by transfer steps between chromophores α_{84}^1 – β_{84}^2 (and their symmetry equivalents α_{84}^2 – β_{84}^3 and α_{84}^3 – β_{84}^1) with an average time of 9.86 ps and between chromophores α_{84}^1 – α_{84}^4 (and their symmetry equivalents α_{84}^2 – α_{84}^5 and α_{84}^3 – α_{84}^6) with an

Table 3. Mass Center and PM3 Dipole Moment for the Aromatic Portions of the Chromophores in the Unit Cell of Phycocyanin From *Fremyella diplosiphon* (pdb Accession Code 1cpc).

Chromophore	Mass center	PM3 dipole moment
α_{84}^1	[29.26, –26.34, 12.23]	[0.81, –0.67, –0.69]
β_{84}^1	[–17.56, –10.77, 17.32]	[–0.56, –0.11, 0.96]
β_{155}^1	[–15.02, –43.93, 8.43]	[0.42, 0.20, 1.85]
α_{84}^6	[–33.52, –20.71, –12.39]	[–1.84, –0.74, 0.94]
β_{84}^6	[15.36, –13.83, –17.49]	[1.02, –0.35, –1.14]
β_{155}^6	[7.22, –46.12, –8.34]	[–0.91, 0.43, –2.18]

Table 4. Highest Intra-Phycocyanin Fluorescence Resonance Energy Transfer Constants.

Pair	Distance (Å)	κ	K_{DA}^{-1} (ps)	K_{AD}^{-1} (ps)
$\alpha_{84}^4-\beta_{84}^6$	20.6	-1.04	5.98	9.20
$\alpha_{84}^5-\beta_{84}^4$	20.6	-1.04	5.94	9.15
$\alpha_{84}^6-\beta_{84}^5$	20.6	-1.04	5.96	9.18
$\alpha_{84}^1-\beta_{84}^2$	20.6	-0.802	10.0	15.4
$\alpha_{84}^2-\beta_{84}^3$	20.6	-0.810	9.86	15.2
$\alpha_{84}^3-\beta_{84}^1$	20.6	-0.815	9.73	15.0
$\alpha_{84}^1-\alpha_{84}^4$	26.3	1.13	22.6	22.6
$\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5$	26.3	1.13	22.6	22.6
$\alpha_{84}^3-\alpha_{84}^6$	26.3	1.13	22.6	22.6
$\beta_{155}^1-\beta_{155}^6$	27.9	-0.658	44.7	44.7
$\beta_{155}^2-\beta_{155}^5$	27.9	-0.658	44.7	44.7
$\beta_{155}^3-\beta_{155}^4$	27.9	-0.660	44.5	44.5

For each of the interacting pair of chromophores, distances between their mass centers and orientation coefficients (κ) between their dipole moments are shown. The reciprocal of the forward ($1/K_{DA}$) and backward ($1/K_{AD}$) Förster constant in picosecond units are also included. The latter are estimates of the time a photon takes to be transferred from the donor chromophore (D) to the acceptor chromophore (A) and vice versa. Because the PC hexamer under study was created by applying symmetry operators to the structure of a dimer, transfer constants between pair of symmetry equivalent chromophores (e.g., $\alpha_{84}^4-\beta_{84}^6$, $\alpha_{84}^5-\beta_{84}^4$, and $\alpha_{84}^6-\beta_{84}^5$) are very similar.

average time of 22.6 ps. All the above-mentioned transfer steps can be joined to define three internal pathways: [$\beta_{84}^1-\alpha_{84}^3-\alpha_{84}^6-\beta_{84}^5$], [$\beta_{84}^2-\alpha_{84}^1-\alpha_{84}^4-\beta_{84}^6$], and [$\beta_{84}^3-\alpha_{84}^2-\alpha_{84}^5-\beta_{84}^4$]. These pathways connect chromophores β_{84} from different trimers in 43.6 ps. $\beta_{155}-\beta_{155}$ light transfer steps take 44.6 ps on average and on their own define three external pathways: [$\beta_{155}^1-\beta_{155}^6$], [$\beta_{155}^2-\beta_{155}^5$], and [$\beta_{155}^3-\beta_{155}^4$] connecting chromophores β_{155} from different trimers. Photons absorbed by any chromophore in the upper trimer of PC will be transferred to chromophores in the lower trimer of the PC hexamer by one of these pathways. We refer to these pathways as preferential pathways and summarize them in Table 4 and Figure 1.

The model for light transfer shown in Table 4 is striking in that it only uses the 12 transfer steps with the shortest transfer times out of the 153 possible pairs of chromophores inside a PC hexamer. Six preferential pathways allow defining short intra-phycocyanin transfer times, because of a small number of quick steps per pathway (between one and three). This model is compatible with the short time and high quantum efficiency observed for energy transfer in PBPBs and PBSs.^{9,10} If we were to consider the next shortest transfers, i.e., those between chromophores $\beta_{84}^1-\beta_{84}^5$, $\beta_{84}^2-\beta_{84}^6$, and $\beta_{84}^3-\beta_{84}^4$, the model does not gain any extra functionality as a pathway connecting chromophores β_{84} from different trimers already exists. Also, these steps are too slow (101 ps) to be of importance in the energy transfer of a phycobilisome in vivo.

An analysis of the intra-phycocyanin light transfer pathways in rods of *Fremyella diplosiphon* has been previously published.²¹ In their work, Duerring et al. approximated the dipole moments to the line fitted to the conjugated portions of the chro-

mophores, and reported dipole moments in the opposite direction, which differ on average by 150° to those reported in this study. Transfer constants of 6.24, 38.3, and 108 ps for pairs $\alpha_{84}-\beta_{84}$, $\alpha_{84}-\alpha_{84}$, and $\beta_{155}-\beta_{155}$, respectively, were reported on the basis of their calculations. The differences between the results previously obtained and those presented here are principally because of the different determination of the dipole moments of the chromophores. Because the $\pi-\pi^*$ electronic transitions, for quantum states of the delocalized electrons belonging to each chromophore are involved in the energy trans-

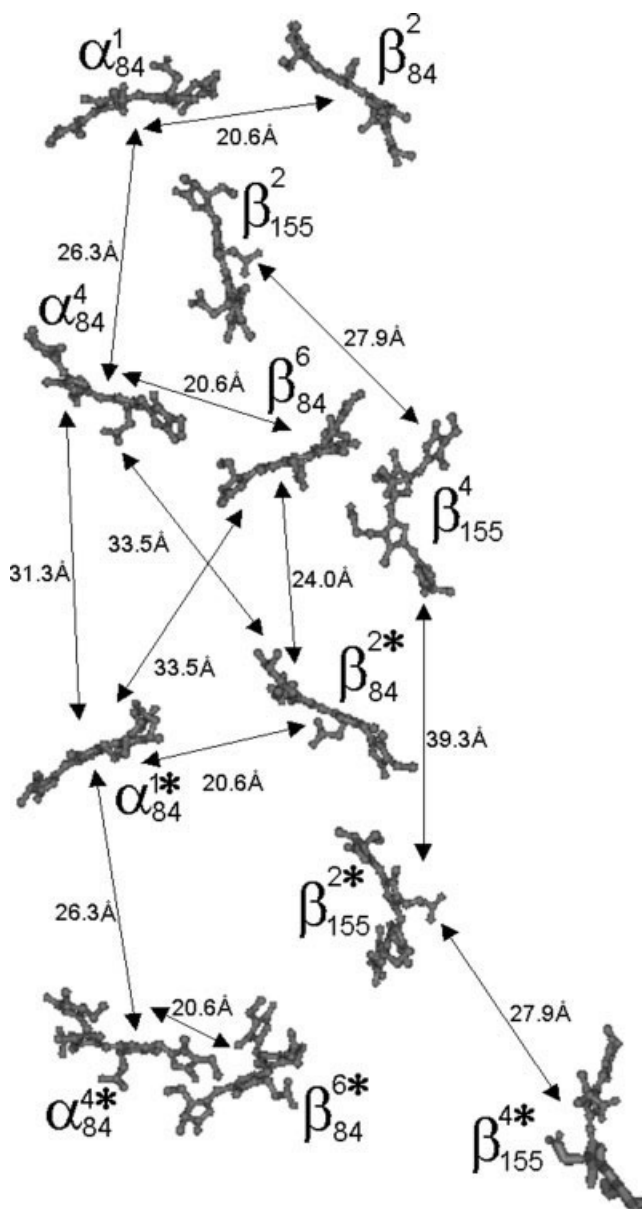


Figure 1. Intra-phycocyanin and inter-phycocyanin preferential light transfer pathways in the rods from *Fremyella diplosiphon*, showing the distances between the centers of mass of the chromophores. Only the pathways in an $(\alpha\beta)_2$ dimer of each hexamer are shown.

Table 5. Clusters of the Putative Models for a Complex of Two Phycocyanin Hexamers from *Fremyella diplosiphon*.

Number of models	Surface matching (Å ²)	Solvation energy (kcal/mol)	Global score	Inter-phycocyanin rotation	Inter-phycocyanin distance (Å)
3	1519	-10.86	0.18	9.5°	55.4
16	1224	-10.16	0.52	15.0°	56.0
3	1427	-18.43	0.73	20.5°	55.6
1	1792	-9.75	0.00	24.5°	54.4
6	1814	-13.17	0.00	30.0°	54.0
13	1803	-9.17	0.00	35.5°	54.6

Positive rotation angles mean rotations of the lower PC anticlockwise around the symmetry axis passing through both centers of the phycocyanin hexamers.

fer among chromophores, the previous calculations and our ones have only considered the aromatic portion of these molecules to calculate the dipole moments. In this work, we have introduced a PM3 semiempirical calculation to determine the dipole moments of the chromophores, whereas Duerring et al. used Schirmer's method of least squares to fit a line to the aromatic portion of the chromophores. Moreover, the previous calculations neglected the spectral differences between the three types of chromophores present in PC. Here, we have used experimentally determined quantum efficiencies, life-times of fluorescence, molar extinction coefficients, and overlap integrals between the emission and absorption fluorescence spectra of the donor and acceptor chromophores for the determination of Förster rate constants. The only other quantum mechanical calculation of dipole moments for chromophores in PBPs reported in the literature is that for phycocyanobilins in PC from *Mastigocladus laminosus*.³⁵ In their calculations, Scharnagl and Schneider used the PPP method and considered the chromophores and their surrounding amino acids as a "super molecule." However, coordinates for the unit cell of PC from *Mastigocladus laminosus* were never deposited in a public repository and a direct comparison of the result of both calculations protocols is not possible. Nevertheless, Scharnagl and Schneider concluded that the direction of the dipole moments is essentially parallel to the long axis of the chromophores. Such a dipole will be similar to those obtained by the least squares method proposed by Schirmer et al.³⁶ and in fact Debreczeny et al. by using both approximations for the dipole moments of the chromophores in PC from *Mastigocladus laminosus* obtained similar FRET constants.³³

An experimental transfer time of 1 ps for the pair α_{84} - β_{84} in trimers of PC from *Synechococcus* sp. PCC 7002 has been previously reported.³⁴ This transfer time corresponds to transfer constants of 1.42 ps from α_{84} to β_{84} and of 3.37 ps from β_{84} to α_{84} (experimental transfer times are the reciprocal of the sum of the forward and backward rate constants for a given pair of chromophores). Zhang et al.²⁴ have reported experimental transfer times of 10 and 20 ps for chromophore pairs α_{84} - α_{84} and β_{155} - β_{155} , respectively, in hexamers of PC from *Anabaena variabilis*. These correspond to rate constants of 20 ps for α_{84} - α_{84} and 40 ps for β_{155} - β_{155} . On the basis of the agreement between these experimental results and the calculations presented here, we consider our estimates of Förster constant rates in PC from *Fremyella diplosiphon* to be an improvement to those previously published.²¹

Docking Model of a Complex of Two Phycocyanins

PBPs do not exist in isolation but rather form supramolecular complexes called PBSs. To study the assembly of two PC hexamers in the rods of the PBSs from *Fremyella diplosiphon*, a protein docking was performed using the software BiGGER. From the 5000 putative models of the complex of two PC hexamers generated by BiGGER, only the 20 top-scored solutions for each of the interaction parameters calculated by the software were selected. It is noteworthy that the 20 best evaluated models according to the BiGGER global score showed the expected back-to-back interaction type for PCs in PBSs' rods.^{11,18,44} Conversely, none of the 20 top models for the electrostatic energy parameter showed this type of interaction. Nineteen out of the 20 top scored complexes according to interaction surface, and 11 out of the 20 top scored by solvation energy presented the expected interaction type. Because of the low discriminatory power of the lateral chain interaction parameter (the top 1579 models were assigned the same value), no models using it were selected.

The 50 selected solutions corresponded to 42 different putative models. Solutions were clustered based on inter-phycocyanin rotation angle and distance. Because of the threefold symmetry of the system, models with PCs rotated 120° around the axial axis were considered equivalent. Also, models where the probe PCs just differed by a few Angstroms of translation along a non-principal axis were considered to be equivalent. The resulting six clusters (Table 5) showed inter-phycocyanin distances ranging from 54 to 56 Å, and rotation angles ranging from 9.5° to 35.5°. Where one PC is upside-down (rotated 180° around a nonprincipal axis) the existence of a screw angle between the upper and lower trimers in PC hexamers results in models that show angles of rotation different from multiples of the angular step (15°). Therefore, because of the symmetry of the system studied, although we used an angular step of 15°, we have found solutions, which differ from each other by only 5°.

As shown in Table 5, models with an inter-phycocyanin rotation angle of 30° have the highest surface matching area. This result has been reported by Stec et al. who performed a hexamer contact search for PC from *Cyanidium caldarium*.²³ However, the relationship between geometric complementarity and the different energetic contributions to the stabilization of a system are not necessarily trivial as has been shown for trimers of PC from *Fremyella diplosiphon*.⁴⁵ In fact, Table 5 shows that the

Table 6. Highest Inter-Phycocyanin Fluorescence Resonance Energy–Transfer Constants at Inter-PC Distance of 55.6 Å and 20.5° Inter-PC Rotation.

	Distance (Å)	κ	K_{DA}^{-1} (ps)	K_{AD}^{-1} (ps)
$\beta_{84}^4 - \beta_{84}^{3*}$	24.0	1.23	13.7	13.7
$\beta_{84}^5 - \beta_{84}^{1*}$	24.0	1.23	13.7	13.7
$\beta_{84}^6 - \beta_{84}^{2*}$	24.0	1.22	13.8	13.8
$\alpha_{84}^4 - \beta_{84}^{2*}$	33.5	-1.78	38.1	58.6
$\alpha_{84}^5 - \beta_{84}^{3*}$	33.5	-1.79	38.0	58.5
$\alpha_{84}^6 - \beta_{84}^{1*}$	33.5	-1.79	38.0	58.6
$\beta_{155}^4 - \beta_{155}^{7*}$	39.3	1.90	41.2	41.2
$\beta_{155}^5 - \beta_{155}^{3*}$	39.3	1.90	41.2	41.2
$\beta_{155}^6 - \beta_{155}^{1*}$	39.3	1.90	41.2	41.2
$\alpha_{84}^4 - \alpha_{84}^{1*}$	31.3	1.24	53.5	53.5
$\alpha_{84}^5 - \alpha_{84}^{2*}$	31.3	1.24	53.5	53.5
$\alpha_{84}^6 - \alpha_{84}^{3*}$	31.3	1.24	53.4	53.4
$\beta_{84}^4 - \alpha_{84}^{2*}$	33.5	-1.75	60.5	39.3
$\beta_{84}^5 - \alpha_{84}^{3*}$	33.5	-1.75	60.4	39.2
$\beta_{84}^6 - \alpha_{84}^{1*}$	33.5	-1.75	60.4	39.2

Chromophores on the left belong to the upper phycocyanin hexamer, and the ones on the right (marked with an asterisk) belong to the lower hexamer in the complex.

best scored solutions are those in the cluster with inter-phycocyanin distances of 55.6 Å and a rotation angle of 20.5°. The three solutions in that cluster have the highest solvation energies, and appear in the third, fourth, and sixth positions of the global score. Therefore, these inter-phycocyanin distance and rotation angle were used for the study of the inter-phycocyanin transfer pathways. Similar results (inter-hexamer rotation of 23° and inter-phycocyanin distance of 55.1 Å) have recently been obtained for

PC rods from *Gracilaria chilensis* by using a different docking algorithm.⁴⁶

Inter-Phycocyanin Preferential Light Transfer Pathways

We can extend our intra-phycocyanin preferential transfer pathways model to include inter-phycocyanin transfers. On the basis of the above-mentioned docking results, we assume that two neighboring PCs in the rods from *Fremyella diplosiphon*'s PBSs are rotated 20.5° from each other with a distance between their mass centers of 55.6 Å. If we limit our search to transfers between chromophores in the lower trimer of the upper PC, and the upper trimer of the lower PC, 81 paths exist. Similarly to intra-phycocyanin transfers, in the inter-phycocyanin transfers one group is by far faster than the rest. The 15 preferential pathways are shown in Table 6 and Figure 1. The closest chromophores in the complex containing two PC hexamers are those attached to positions β_{84} . Not surprisingly, $\beta_{84} - \beta_{84}^*$ transfer takes on average 13.7 ps (where * means that the chromophore belongs to the lower hexamer of the complex). The next closest pair of chromophores corresponds to those in positions α_{84} . However, their interaction is not the second fastest but the fourth with transfer taking on average 53.5 ps. Interestingly, the $\beta_{155} - \beta_{155}^*$ pairs are the most separated, yet the high orientation coefficient for their dipole moments position them as the third quickest transfer. These cases confirm the importance of not only the distance, but also the orientation factor in the Förster formulation. Transfers from chromophores α_{84} to β_{84}^* and from chromophores β_{84} to α_{84}^* are also included in the preferential pathways. The six intra-phycocyanin preferential light transfer pathways become 15 inter-phycocyanin preferential light transfer pathways.

Figure 2 shows the $\alpha_{84} - \alpha_{84}^*$, $\alpha_{84} - \beta_{84}^*$, $\beta_{84} - \alpha_{84}^*$, $\beta_{84} - \beta_{84}^*$, and $\beta_{155} - \beta_{155}^*$ inter-phycocyanin transfer constants between neighboring hexamers as a function of the inter-phycocyanin

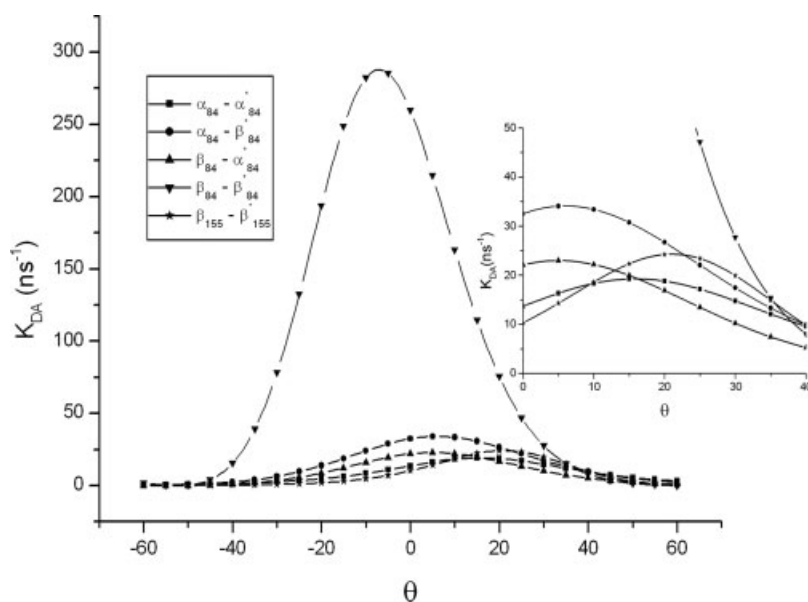


Figure 2. Förster constants for inter-phycocyanin FRET pathways as a function of the inter-phycocyanin rotation angle. An inter-phycocyanin distance of 55.6 Å has been assumed.

rotation angle. The analysis of the curves reveals that the transfer constant between chromophores $\beta_{84}-\beta_{84}^*$ reach a maximum far higher than that on optimally packed rods (inter-phycoyanin rotation of 20.5°). The rest of the preferential pathways in the optimally packed rods show transfer constants similar to the maximum obtained in this study. The $\beta_{155}-\beta_{155}^*$ pair is the only inter-phycoyanin pathway connecting β_{155} chromophores from neighboring hexamers. Remarkably, the transfer between chromophores at positions β_{155} is maximized at the angle of rotation predicted by the docking model. This indicates the crucial role of this inter-phycoyanin channel in defining the complete FRET process in *Fremyella diplosiphon*'s PBSs.

Duerring et al. assumed an interhexamer distance of 60 Å and no interhexamer rotation when studying inter-phycoyanin transfer pathways, quoting crystal packing, and electron micrographs as guidelines.²¹ The only strong coupling reported was $\beta_{84}-\beta_{84}^*$ with a transfer constant of 46.7 ps. In this report, we have been able to identify 15 channels of energy transfer between neighboring PC hexamers. Depending on what chromophore is initially excited, our results show that the energy will be transferred to the neighboring PC hexamer between 13.7 and 85.8 ps. These transfer constants are in agreement with experimental transfer times in the range of 45 to 130 ps along PC rods composed of one to four hexamers.⁴⁷

Conclusions

Using the Förster formulation of FRET and combining the PM3 calculations of the dipole moments of the aromatic portions of the chromophores, docking process via BiGGER software, and experimental data for quantum efficiencies, lifetimes of fluorescence, molar extinction coefficients, and overlap integrals, a semiempirical methodology to model the intra-phycoyanin and the inter-phycoyanin FRET pathways in PBSs from *Fremyella diplosiphon* was developed. We identified six intra-phycoyanin and 15 inter-phycoyanin FRET preferential pathways, with transfer constants in agreement with experimental results. It seems that whereas the intra-phycoyanin pathways are optimized for speed, the inter-phycoyanin pathways maximize the number of channels of transference between neighbor hexamers. Our study also predicts the quaternary structure of a rod from *Fremyella diplosiphon*. The study of the inter-phycoyanin FRET pathways between pairs of chromophores belonging to different PC hexamers as a function of the inter-phycoyanin rotation angle reveals the crucial role of the inter-phycoyanin channel connecting β_{155} chromophores to define the complete set of FRET pathways in the system. We conclude that the close agreement between experimental results and our theoretical calculations, as well as the correspondence between the inter-phycoyanin angles of rotation calculated so as to maximize inter-phycoyanin FRET constant and that calculated by protein docking to be the result of the use of PM3 dipole moments for the chromophores in this study.

References

- Gantt, E. In *Biology of Red Algae*; Cole, K. M.; Sheath, R. G., Eds.; Cambridge University Press: New York, 1990, pp. 203–219.
- Förster, Th. W. *Ann Phys (Berlin)* 1948, 2, 55.
- Förster, Th. W. In *Modern Quantum Chemistry*; Sinanoğlu, O., Ed.; Academic Press: New York, 1965, pp. 93–137.
- Förster, Th. W. In *Comprehensive Biochemistry*; Florin, M.; Stotz, E. H., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1967, pp. 61–77.
- Agranovich, V. M.; Galanin, M. D. *Electronic Excitation Energy Transfer in Condensed Matter*; North-Holland: Amsterdam, 1982.
- Andrews, D. L.; Demidov, A. A. *Resonance Energy Transfer*; Wiley: Chichester, 1999.
- Redlinger, T.; Gantt, E. *Plant Physiol* 1981, 68, 1375.
- Glazer, A. N. *Annu Rev Biophys Chem* 1985, 14, 47.
- Pullerits, T.; Sundstrom, V. *Acc Chem Res* 1996, 29, 381.
- Glazer, A. N. *J Biol Chem* 1989, 264, 1.
- Ducret, A.; Sidler, W.; Wehrli, E.; Frank, G.; Zuber, H. *Eur J Biochem* 1996, 236, 1010.
- Glazer, A. N. *Ann Rev Microbiol* 1982, 36, 173.
- Zolla, L.; Bianchetti, M.; Rinalducci, S. *Eur J Biochem* 2002, 269, 1534.
- Ajlani, G.; Vernotte, C. *Eur J Biochem* 1998, 257, 154.
- Lundell, D. J.; Glazer, A. N. *J Biol Chem* 1983, 258, 902.
- Lundell, D. J.; Glazer, A. N. *J Biol Chem* 1983, 258, 8708.
- Yamanaka, G.; Glazer, A. N.; Williams, R. C. *J Biol Chem* 1980, 255, 11004.
- Lundell, D. J.; Yamanaka, G.; Glazer, A. N. *J Cell Biol* 1981, 91, 315.
- Yu, M. H.; Glazer, A. N.; Williams, R. C. *J Biol Chem* 1981, 256, 13130.
- Schirmer, T.; Bode, W.; Huber, R.; Sidler, W.; Zuber, H. *J Mol Biol* 1985, 184, 257.
- Duerring, M.; Schmidt, G. B. Huber, R. *J Mol Biol* 1991, 217, 577.
- Sauer, K.; Scheer, H.; Sauer, P. *Photochem Photobiol* 1987, 46, 427.
- Stec, B.; Troxler, R. F.; Teeter, M. M. *Biophys J* 1999, 76, 2912.
- Zhang, J.; Zhao, F.; Zheng, X.; Wang, H. *Chem Phys Lett* 1999, 304, 357.
- Demidov, A. A.; Borisov, A. Y. *Biophys J* 1993, 64, 1375.
- Pizarro, S. A.; Sauer, K. *Photochem Photobiol* 2001, 73, 556.
- Dexter, D. L. *J Chem Phys* 1953, 21, 836.
- Jang, S.; Newton, M. D.; Silbey, R. J. *Phys Rev Lett* 2004, 92, 218301.
- Mukai, K.; Abe, S.; Sumi, H. *J Phys Chem B* 1999, 103, 6096.
- Sumi, H. *J Phys Chem B* 1999, 103, 252.
- Scholes, G. D. *Annu Rev Phys Chem* 2003, 54, 57.
- Scholes, G. D.; Fleming, G. R. *J Phys Chem B* 2000, 104, 1854.
- Debreczeny, M. P.; Sauer, K.; Zhou, J.; Bryant, D. A. *J Phys Chem* 1995, 99, 8412.
- Debreczeny, M. P.; Sauer, K.; Zhou, J.; Bryant, D. A. *J Phys Chem* 1995, 99, 8420.
- Scharnagl, C.; Schneider, S. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1991, 8, 129.
- Schirmer, T.; Huber, R.; Schneider, M.; Bode, W.; Miller, M.; Hackert, M. L. *J Mol Biol* 1986, 188, 651.
- Stewart, J. J. P. *J Comput Chem* 1989, 10, 209.
- Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Zakrzewski, V. G.; Montgomery, J. A. J.; Stratmann, R. E.; Burant, J. C.; Dapprich, S.; Millam, J. M.; Daniels, A. D.; Kudin, K. N.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Tomasi, J.; Barone, V.; Cossi, M.; Cammi, R.; Mennucci, B.; Pomelli, C.; Adams, C.; Clifford, S.; Ochterski, J.; Petersson, G. A.; Ayala, P. Y.; Cui, Q.; Morokuma, K.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Cioslowski, J.; Ortiz, J. V.; Baboul, A. G.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Gom-

- perts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Gonzalez, C.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Gonzalez, C.; Head-Gordon, M.; Replogle, E. S.; Pople, J. A. Gaussian 98, Revision A. 7, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 1998.
39. Schirmer, T.; Bode, W.; Huber, R. *J Mol Biol* 1987, 196, 677.
40. Grabowski, J.; Gantt, E. *Photochem Photobiol* 1978, 28, 47.
41. Kleima, F. J.; Hofmann, E.; Gobets, B.; van Stokkum, I. H. M.; van Grondelle, R.; Diederichs, K.; van Amerongen, H. *Biophys J* 2000, 78, 344.
42. Palma, P. N.; Krippahl, L.; Wampler, J. E.; Moura, J. J. G. *Proteins* 2000, 39, 372.
43. Krippahl, L.; Moura, J. J.; Palma, P. N. *Proteins* 2003, 52, 19.
44. Jiang, T.; Zhang, J. P.; Chang, W. R.; Liang, D. C. *Biophys J* 2001, 81, 1171.
45. Karshikov, A.; Duerring, M.; Huber, R. *Protein Eng* 1991, 4, 681.
46. Contreras-Martel, C.; Matamala, A.; Bruna, C.; Poo-Caamaño, G.; Almonacid, D.; Figueroa, M.; Martínez-Oyanedel, J.; Bunster, M. *Biophys Chem* 2007, 125, 388.
47. Holzwarth, A. R. *Physiol Plant* 1991, 83, 518.

The structure at 2 Å resolution of Phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PC–PC complex[☆]

Carlos Contreras-Martel^b, Adelio Matamala^d, Carola Bruna^a, German Poo-Caamaño^c, Daniel Almonacid^a, Maximiliano Figueroa^a, José Martínez-Oyanedel^a, Marta Bunster^{a,*}

^a Laboratorio de Biofísica Molecular, Grupo de Biología Estructural, Depto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile

^b Institut de Biologie Structurale, CEA-CNRS-UJF, Grenoble, France

^c Universidad del Bío-Bío, Concepción, Chile

^d Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Facultad de Ciencias Químicas, Depto. de Físico-Química, Universidad de Concepción, Chile

Received 5 August 2006; received in revised form 28 September 2006; accepted 29 September 2006

Available online 10 November 2006

Abstract

Phycocyanin is a phycobiliprotein involved in light harvesting and conduction of light to the reaction centers in cyanobacteria and red algae. The structure of C-phycocyanin from *Gracilaria chilensis* was solved by X-ray crystallography at 2.0 Å resolution in space group P2₁. An interaction model between two PC heterohexamers was built, followed by molecular dynamic refinement. The best model showed an inter-hexamer rotation of 23°. The coordinates of a PC heterohexamer ($\alpha\beta$)₆ and of the PC–PC complex were used to perform energy transfer calculations between chromophores pairs using the fluorescence resonance energy transfer approach (FRET). Two main intra PC ($^1\beta_3^{82} \rightarrow ^1\alpha_1^{84} \rightarrow ^1\alpha_5^{84} \rightarrow ^1\beta_6^{82}$ and $^1\beta_3^{53} \rightarrow ^1\beta_5^{53}$) and two main inter PC ($^1\beta_6^{82} \rightarrow ^1\beta_3^{82}$ and $^1\beta_5^{53} \rightarrow ^1\beta_3^{53}$) pathways were proposed based on the values of the energy transfer constants calculated for all the chromophore pairs in the hexamer and in the complex.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Structure; Phycocyanin; *Gracilaria chilensis*; Protein–protein docking; Energy transfer pathway

1. Introduction

Phycobilisomes (PBS) are auxiliary photosynthetic complexes present in cyanobacteria and eukaryotic red algae. They are composed of phycobiliproteins (PBP) and linker polypeptides. Phycobiliproteins are highly fluorescent proteins due to the presence of covalently bonded chromophores to their cysteine residues, which provide them the functional properties to absorb light at a range of the visible spectrum not fully utilized by chlorophyll. Therefore, improving the light harvesting ability of the algae that contain them [1–3].

Phycobilisomes share a general common morphology [4] that consists of a core of face-to-back cylinders formed by stacked

discs of PBP and several rods that radiate from the core composed of stacked back-to-back discs of PBP. Linker polypeptides are responsible for the maintenance of this structure, providing the necessary structural environment for efficient energy transfer and for the interaction with the photosynthetic reaction center [1,5].

The phycobilisome of *Gracilaria chilensis* contains three phycobiliproteins: Phycoerythrin (PE), phycocyanin (PC) and allophycocyanin (APC) [6,7]. The absorption and emission spectra of these proteins overlap, which allows a non-radiative, direct and efficient transfer of the excitation energy among them ($PE\lambda_{\max}^a = 566$ nm $PE\lambda_{\max}^{em} = 574$ nm; $PC\lambda_{\max}^a = 621$ nm $PC\lambda_{\max}^{em} = 640$ nm; $APC\lambda_{\max}^a = 651$ nm $APC\lambda_{\max}^{em} = 660$ nm). This transfer is channeled along an energy gradient from the rods to the core and finally transferred to chlorophyll *a* in the thylakoid membrane [1,3].

In *G. chilensis*, the rods are composed of phycoerythrin and phycocyanin [6]. The three dimensional structure of phycoerythrin from this algae was reported in 2001 [7]. The structure of the

[☆] C.C.-M. and J.M.-O. contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel.: +56 41 203822; fax: +56 41 239687.

E-mail address: mbunster@udec.cl (M. Bunster).

next component of the rods, phycocyanin, is now presented in this paper. The structures of other phycocyanins from *Fremyella diplosiphon* (1cpc) [8], *Spirulina platensis* (1gho) [9], *Synechococcus vulcanus* (1i7y) [10,11] and *Synechococcus elongatus* (1jbo) [12] have been reported previously. The structure of phycocyanin from *Polysiphonia ureceolata* (1f99) [13] and *Cyanidium caldarium* (1phn) [14] have also been reported. These structures present a common subunit organization that consists of one α subunit (with cyanobilin (CB) associated to Cys84) and one β subunit (with cyanobilins covalently attached to Cys82 and Cys153). They interact to form a heterodimer ($\alpha\beta$) or a “pseudo monomer” that aggregates to form an hexameric ring ($\alpha\beta$)₆ able to pile up to form the main frame of a rod.

The rods in phycobilisomes normally include two or more phycocyanin hexamers and in this alga there are also one or more PE hexamers. Theoretical and experimental studies have been reported regarding the light transfer among chromophores inside one hexameric ring [8,14–17], including models that represent the energy transfer between hexamers [8,14,16]. In these studies, preferential energy transfer pathways have been proposed from data calculated using the Förster resonance approach [18], considering only the chromophore–chromophore distances and a Förster radius of 50 Å as approximation [8] or the orientation among the transition dipole moments in one trimer of phycocyanin [19,20].

This paper reports the three dimensional structure of phycocyanin from *G. chilensis*, the building of a docking model of two PC hexamers refined by molecular dynamics and the determination of the constants for the energy transfer in resonance between pairs of chromophores. For the latter purpose the orientation factors between pairs of chromophores were calculated from the dipole moments of their aromatic portions. The transfer constants were used to propose preferential pathways for the light conduction intra and inter hexamers of phycocyanin.

2. Materials and methods

2.1. Protein purification and crystallization

Phycocyanin from *G. chilensis* was purified according to Gantt [21]. Phycobiliproteins were extracted from algae collected at Coliumo Bay, Dichato, after maceration of N₂(l)-frozen algae, in 20 mM phosphate buffer pH 7.0. The extract was fractionated with ammonium sulphate (30% and 60% saturation). The pellet was dissolved in distilled water and dialyzed against 5 mM phosphate buffer pH 7.0. The phycobiliproteins were separated by anion exchange chromatography (Fractogel EMD DEAE 650S) in an FPLC system (Merck-HITACHI) using 5 mM phosphate buffer as an equilibrium buffer and eluting the proteins with a linear gradient from 5 to 300 mM sodium phosphate pH 7.0. The phycobiliprotein content of the eluted fractions was analyzed by absorption at 566 nm, 621 nm and 651 nm. The phycocyanin-rich fraction was dialyzed against 900 mM phosphate pH 7.0 to precipitate phycocyanin and separate it from other phycobiliprotein contaminants. The phycocyanin precipitate was dissolved in 1 ml of 50 mM phosphate buffer pH 7.0. The protein concentration was estimated by the absorption at 280 nm and

the purity was assessed by 12.5% SDS-PAGE and absorption and emission spectra. Crystals were grown by the vapor-diffusion method using sitting-drop insets at 291 K. 1 ml of 50 mM HEPES buffer pH 7.0, 1.2 M ammonium sulphate was used in the reservoir. The 10 μ l droplet contained reservoir solution and protein at a concentration of 18 mg ml⁻¹ in a 1:1 ratio.

2.2. Data collection, structure solution and refinement

The data was collected at the IMCA-CAT Synchrotron in Argonne with an ADSQ detector with an exposition time of 10 s per frame ($\lambda = 1.00$ Å) and processed with XDS [22]. The initial phases were obtained by Molecular Replacement [23,24] in the program package CNS [25] using the structure of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (1gho) [9] as a searching model. Sessions of manual rebuilding with TURBO FRODO [26] and refinement with CNS were performed. Lateral chains were assigned according to the residual electron density maps and to multiple sequence alignment of homologous proteins. After several cycles of refinement in the resolution range 60–2.0 Å the R_{work} and R_{free} converged. The stereochemistry was verified with PROCHECK [27] and the refined model was deposited in the Protein Data Bank (code 2bv8).

2.3. Phycocyanin–phycocyanin interaction model

The coordinates of 2bv8 were used for the docking procedure of two phycocyanin molecules performed with the program ZDOCK [28,29], with 6° angular steps. The docking models were scored by the program considering desolvation, electrostatic and hydrophobic contributions [30–32]. The models generated were then analyzed to select those in agreement with the reported electron micrographs images [4]. The selected models were characterized by the number of hydrophobic residues in the interface using the protein–protein interaction server [33] and by the number of H-bonds in the interface using the program HBPLUS [34]. The highest scored rigid model was refined by molecular dynamics using the Force Field OPLS/AA [35] with the program GROMACS [36], with which a simulated annealing protocol for 200 ps produced the convergence of the system. The coordinates of the chromophores in the final PC–PC interaction model were used to evaluate the energy transfer constants.

2.4. Energy transfer calculations

Förster theory has been confirmed to be a good approximation to study the light transfer processes occurring in phycobilisomes [19,20]. Förster defines [18] a transfer constant k_{DA} as a measure of the frequency of events of energy transfer between a Donor (D) and an Acceptor (A). By introducing appropriate constants, the Förster equation can be expressed as a product of four terms.

$$k_{DA} = C \cdot G \cdot S \cdot I \quad (1)$$

where C is a collection of constants that considers a refraction index $n = 1.567$ [19,20,37,38], S include the spectroscopic properties of the interacting chromophores, I is the overlap

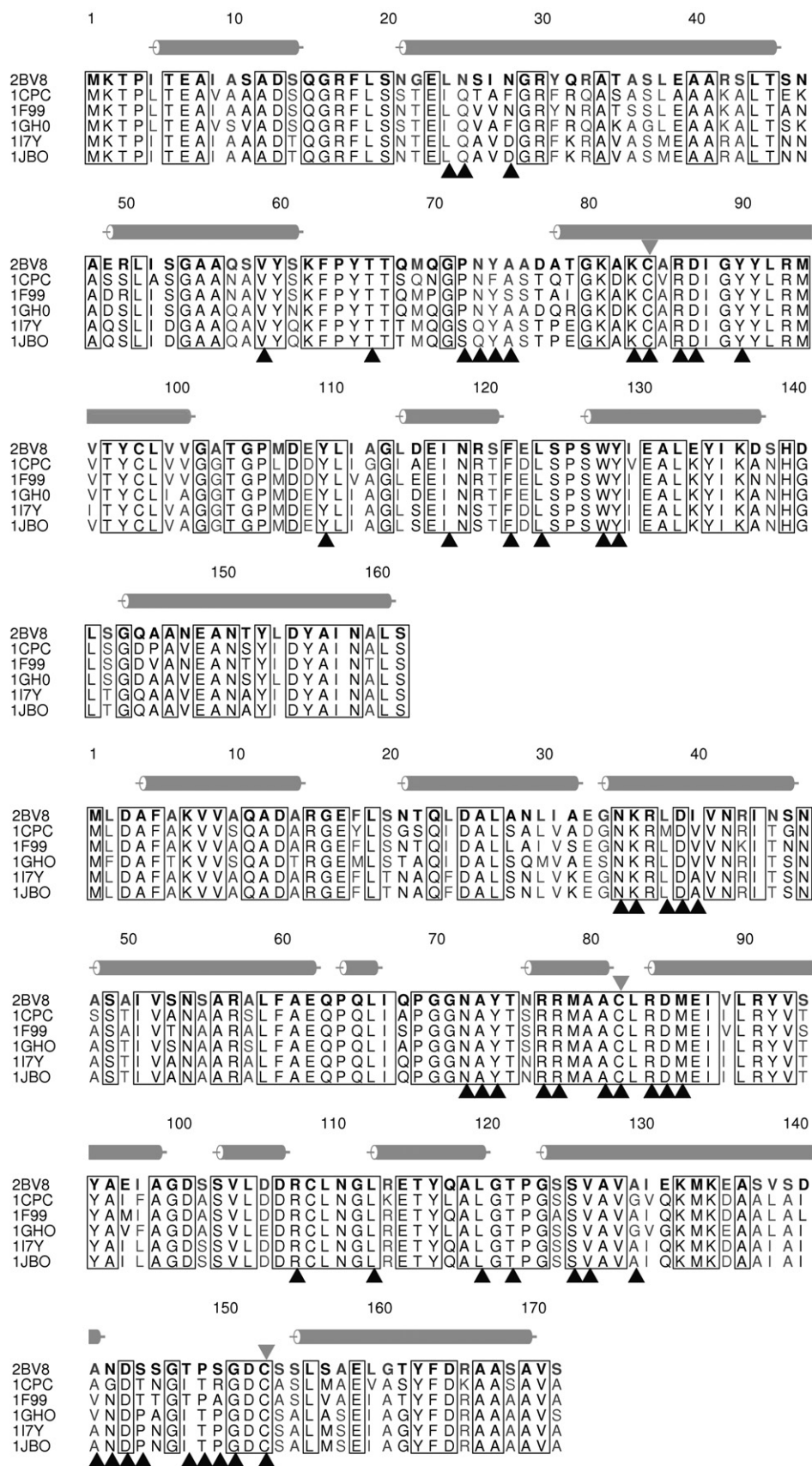


Table 1
Data collection, refinement and Ramachandran plot statistics

Data collection	
Space group	P2 ₁
Unit cell (Å)	
a	101.99
b	151.80
c	101.55
α=γ	90.00
β	117.45
Resolution (Å)	2.0
Number of observed reflections	178,325
Number of unique reflections	172,985
Completeness (last bin) (%)	93.6 (80.4)
Rsym (last bin) (%)	6 (30)
I/σ(I) (last bin)	18.9 (5.8)
Last resolution shell	2.0–2.12
Refinement	
Protein atoms	15,024
Water molecules	1,008
Heterogenic atoms	780
R _{work} /R _{free}	19.9/23.1
Average B-factor, protein (Å ²)	28.4
Average B-factor, solvent (Å ²)	53.4
Rms deviations bond length (Å)	0.022
Rms deviations bond angle (°)	2.3
Rms deviations dihedral angle (°)	18.8
Ramachandran plot	
Residues in core (%)	1,707 (95.2)
Residues in additional allowed (%)	81 (4.5)
Residues in not allowed (%)	6 (0.3)
Non-glycine non-proline residues	1,794
Total number of residues	2,004

integral between the emission and absorption spectra of the donor and acceptor chromophores respectively as described in [20]. Considering the homology among phycocyanins [39] and the structural similarity of the residues in contact with the chromophores (Fig. 1), the experimental values included in the terms *S* and *I* were assigned as those reported for *Synechococcus* sp PCC 7002 [19,20]. The geometric factor *G*,

$$G = \frac{K_{DA}^2}{R_{DA}^6} \quad (2)$$

includes the distances between the centers of mass for each pair of chromophores R_{DA} , and the dipole orientation coefficient κ_{DA} as described in Eq. (3).

$$\kappa_{DA} = \hat{\mu}_D \cdot \hat{\mu}_A - 3(\hat{\mu}_D \cdot \hat{r}_{DA})(\hat{\mu}_A \cdot \hat{r}_{DA}) \quad (3)$$

where $\hat{\mu}_D$ and $\hat{\mu}_A$ are unit vectors describing the direction of the transition dipole moments of the donor and acceptor chromophores respectively and \hat{r}_{DA} is the unit vector describing the

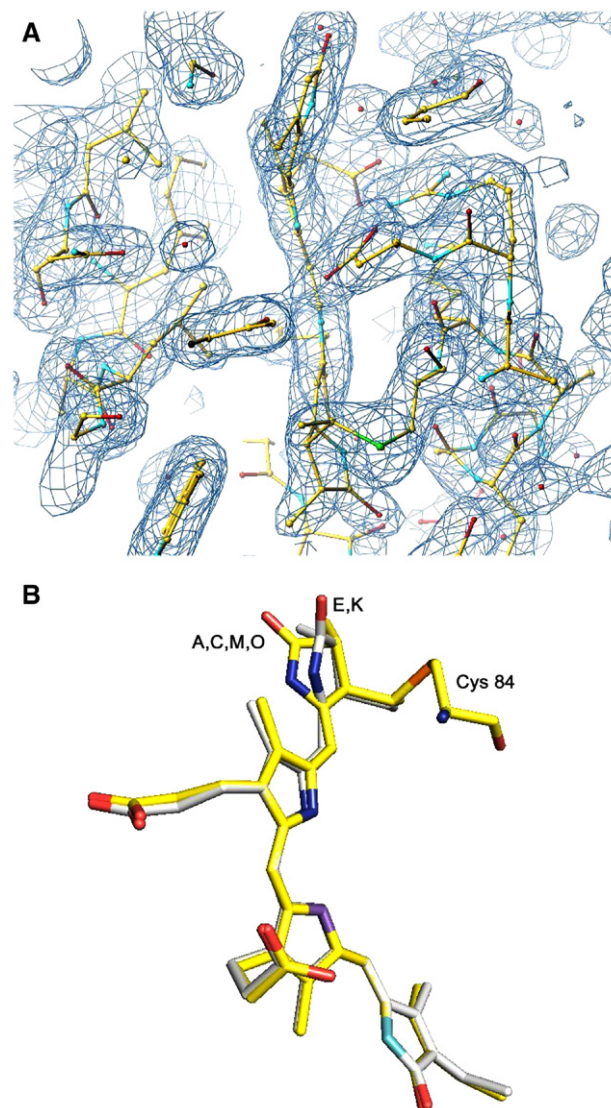


Fig. 2. Conformation of chromophores at α^{84} . A) Fo–Fc electron density map showing the electron density of chromophore at α^{84} in chain K. B) Superposition of the chromophores at α^{84} in chains A (also representing chains C, M and O) and E (also representing chain K).

direction of the line that connects the centers of mass of the interacting chromophores. The transition dipole moments were approximated to the dipole moments of the conjugated fragments [40] of the chromophores reported in 2bv8 and calculated by applying the semi empirical method PM3 Hamiltonian implemented in the software Gaussian98 [41]. Energy transfer steps with constants higher than 20 ns⁻¹ and 10 ns⁻¹ (transfer times shorter than 50 ps and 100 ps) were used to define intra and inter phycocyanin preferential light transmission pathways respectively.

Fig. 1. Sequence and structural alignment of phycocyanin from *G. chilensis*. Sequence and structural alignment of α (A) and β (B) subunits of C-phycocyanin from *G. chilensis* (2bv8), *F. diplosiphon* (1cpc), *Polysiphonia urceolata* (1f99), *S. platensis* (1gho), *S. vulcanus* (1i7y) and *S. elongatus* (1jbo). The rmsd in Å for the α and β subunits on this comparison are respectively: 1cpc: 0.64–0.78; 1f99: 0.43–0.52; 1gho: 0.62–0.74; 1i7y: 0.50–0.66; 1jbo: 0.51–0.64. The conserved regions are shown with squares. The conserved helical regions are indicated by cylinders drawn at the top of the alignment. The cysteines to which the chromophores are bound are indicated with a full grey inverted triangle. The conserved residues in contact with the chromophores in these structures are indicated by black triangles.

3. Results and discussion

Although other phycobiliproteins are purified along with associated linker polypeptides [42], SDS-PAGE analysis of the purified phycocyanin of *G. chilensis* showed no presence of other polypeptides besides the α and β subunits (data not shown).

Purple crystals appeared in one week and continued to grow for three weeks as rhombohedral sheets of 0.1 mm high and 1 mm wide. The diffraction pattern of the crystals identified the $P2_1$ space group with $a=101.99$ Å, $b=151.80$ Å, $c=101.55$ Å, $\alpha=\beta=90.00^\circ$, $\gamma=117.45^\circ$. The structure was solved as described in Materials and Methods, with data collection up to 2.0 Å. Results on the data statistics, refinement and stereochemistry are shown in Table 1. The good quality of the molecular replacement allowed fitting the template (1gho) onto the electron density maps obtained and substituting the residues as required by the electron density. The lateral chains of highly conserved regions in the structures were maintained (Fig. 1). One hexamer ($\alpha\beta$)₆ was identified in the asymmetric unit. As non-crystallo-

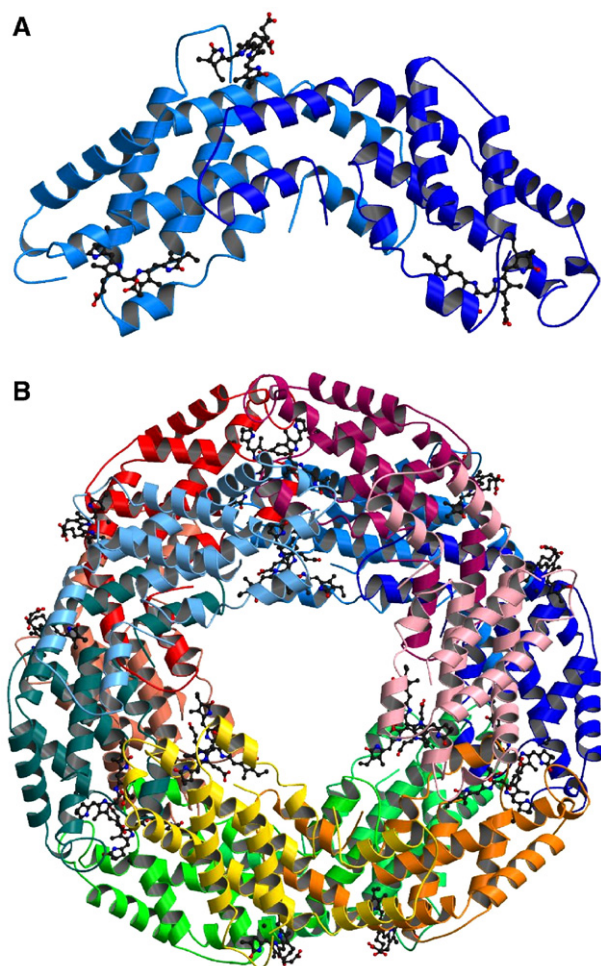


Fig. 3. Representation of the structure of phycocyanin from *G. chilensis*. A) Ribbon representation of the α (light blue) and β (blue) subunits of C-phycocyanin of *G. chilensis*. The chromophores are shown in ball and stick representation. B) The molecule in the asymmetric unit. Ribbon representation of the heterohexamer ($\alpha\beta$)₆. The α subunits are chains A, C, E, K, M, O and the β subunits are chains B, D, F, L, N, P according to the structure deposited in the Protein Data Bank.

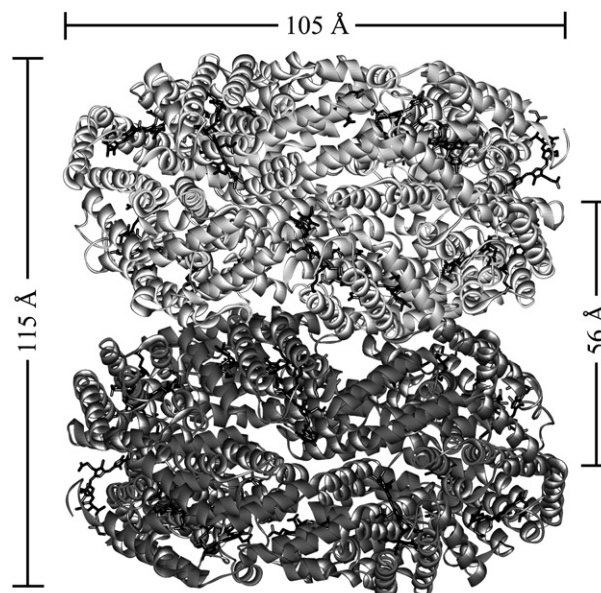


Fig. 4. PC-PC docking model. Ribbon representation of the refined PC-PC model. The general dimensions are indicated. The chromophores are shown in black.

graphic symmetry was not used, each subunit was solved independently 6 times providing confidence in the sequences reported for the α and β subunits. The higher similarity obtained with BLAST [43] was, as expected, with PC from *Gracilaria tenuistipitata*. Nevertheless, there is also a clear sequence and structural similarity with all the other phycocyanins deposited at the Protein Data Bank, as it is shown on Fig. 1. The final model converged to a R_{work} of 19.9% and R_{free} of 23.1%. The stereochemistry was also adequate and it is reported on Table 1, with the exception of Thr⁷⁵, which occupied a disallowed region of the Ramachandran plot. This finding is present in all the structures of phycobiliproteins reported until now, regardless the type of phycobiliprotein or the space group. Asn 72 are methylated in all solved PC, including the one reported in this paper. The crystallographic data has been deposited at the Protein Data Bank under the accession code 2bv8.

Phycocyanin from *G. chilensis* is formed by six α subunit (162 residues and one phycocyanobilin covalently bound to C⁸⁴) and six β subunit (172 residues and two phycocyanobilins associated to C⁸² and C¹⁵³). Fig. 2A shows the 2Fo-Fc electron density map corresponding to phycocyanobilin associated to Cys 84 in chain K. Both subunits contain a globulin like fold and they interact to form a heterodimer ($\alpha\beta$) that oligomerises to a hexamer ($\alpha\beta$)₆ as is shown on Fig. 3. The structure allows the piling up and organization in phycobilisome rods. The hexamer is stabilized by hydrogen bonding and hydrophobic interactions. The structural analysis shows that H-bonds that involve α subunits are participating in the stabilization of the hexamer and those between atoms of the β subunits are responsible for the lateral stabilization of the trimer ($\alpha\beta$)₃. Aspartic acids (D_{α}^{13} , D_{β}^{13} , D_{β}^{39}) interact with A and D rings of the respective chromophore. The involvement of Aspartic acids maintaining the curvature of phycobilins has been reported in all the phycobiliproteins [7,44] and it may be a relevant feature for the biological activity.

The docking procedure performed by ZDOCK [29] involved a rigid body interaction of two hexamers of phycocyanin (PC). The models generated were evaluated by the program using desolvation, electrostatic properties and hydrophobic interactions. The top models ranked by ZDOCK reproduced the piling of PBPs as proposed by electron micrographs of the rods [4]. Even though it has been reported that for surface recognition a rigid body approach is adequate, a molecular dynamics procedure with the whole structure was performed in order to optimize contacts and to obtain better packed interaction surfaces [45]. The docking complex with the highest hydrophobic character in its interaction surface was refined by molecular dynamics as described in Materials and Methods. This produced modifications in the surfaces while preserving the relative position of the chromophores. The refined model presents a surface with less hydrophobic patches and an increased number of H-bonds (30 to 35) and salt bridges (3 to 7) between hexamers. The final complex is shown on Fig. 4. A rotation between hexamers was detected, which has previously been reported by Stec et al. [14] in a docking model of phycocyanin from *C. caldarium*. Thus, the best packing of the hexamers in a rod should be accomplished by a rotation of one over the other. This model allows a better packing of the side chains, increasing the number of interactions and improving the stability of the complex. This stable model was used to establish the coordinates of every chromophore for the determination of the energy transfer network in a PC–PC complex. Previous studies performed by our group [40] for phycocyanin from *F. diplosiphon*, show that a 20.5° rotation not only improves the packing of hexamers in a PC–PC complex, but also allows the participation of all the chromophores in the light transfer process, explaining the high efficiency of the system.

The calculation of k_{DA} between all chromophores pairs was performed using the extended Eq. (1) with the orientation factors calculated from the dipole moments as described in Materials and Methods.

Our results confirm that the transfer constants are very dependent on the geometric and spectroscopic factor of the chromophores, but the dependence is stronger for the distances between chromophore pairs as it is shown on Table 2. At identical distances, the geometric factor becomes more important. Energy transfer steps for all chromophore pairs in our system were calculated and the value of the inverse of the transfer constant expressed in ps for the intra- or inter-phycocyanin steps are shown on Table 2. As hexamers of phycocyanin present high symmetry, in previous works, the analysis of possible light transfer pathways were performed in 1/3 of the biological unit. In our case, as the structure was solved with one hexamer per asymmetric unit, slight differences in the conformation of equivalent chromophores were detected, specially for the chromophores at chain E(α_3^{84}) and K(α_6^{84}), which present a rotation of ring D as shown on Fig. 2B. This conformational diversity also contributes to the differences in the values of k_{DA} or k_{AD} for equivalent pairs of chromophores. The most significant differences are observed in the inter-hexamer steps of the pathway shown on Table 2. Differences of distances and orientation factors explain the different times obtained for equivalent steps.

Table 2

Characteristics of energy transfer steps between pairs of chromophores

Intra-hexamer					
Pair	Distance(Å)	Angle (°)	Kappa	1/ k_{DA} (ps)	1/ k_{AD} (ps)
<i>Internal energy transfer pathways</i>					
$\alpha_1^{84}-\beta_3^{82}$	20.6	61.33	-1.26	6.27	4.07
$\alpha_3^{84}-\beta_2^{82}$	20.5	93.81	-1.17	7.17	4.66
$\alpha_2^{84}-\beta_1^{82}$	20.7	64.70	-1.27	6.39	4.15
$\langle\alpha^{84}-\beta^{82}\rangle$	20.6			6.61	4.29
$\alpha_1^{84}-\alpha_5^{84}$	25.6	66.75	1.18	16.90	16.90
$\alpha_3^{84}-\alpha_4^{84}$	25.6	88.71	1.37	13.10	13.10
$\alpha_2^{84}-\alpha_6^{84}$	25.6	81.03	1.26	15.00	15.00
$\langle\alpha^{84}-\alpha^{84}\rangle$	25.6			15.00	15.00
$\alpha_4^{84}-\beta_5^{82}$	20.7	74.45	-1.33	5.87	3.81
$\alpha_4^{84}-\beta_5^{82}$	20.6	64.13	-1.34	5.48	3.56
$\alpha_6^{84}-\beta_4^{82}$	20.6	93.04	-1.12	7.84	5.09
$\langle\alpha^{84}-\beta^{82}\rangle$	20.6			6.39	4.15
<i>External energy transfer pathways</i>					
$\beta_1^{53}-\beta_5^{53}$	26.2	158.08	1.52	5.63	5.63
$\beta_3^{53}-\beta_5^{53}$	26.0	161.90	1.55	5.22	5.22
$\beta_2^{53}-\beta_4^{53}$	26.1	162.65	1.50	6.06	6.06
$\langle\beta^{53}-\beta^{53}\rangle$	26.1			5.63	5.63
Interhexamer					
Pair	Distance(Å)	Angle (°)	Kappa	1/ k_{DA} (ps)	1/ k_{AD} (ps)
<i>Internal energy transfer pathways</i>					
$\beta_4^{82}-\beta_1^{82}$	22.02	72.24	0.98	12.67	12.67
$\beta_5^{82}-\beta_2^{82}$	22.78	64.65	1.06	13.39	13.39
$\beta_6^{82}-\beta_3^{82}$	21.23	74.14	0.98	10.21	10.21
$\langle\beta^{82}-\beta^{82}\rangle$	22.03			12.09	12.09
<i>External energy transfer pathways</i>					
$\beta_4^{53}-\beta_2^{53}$	39.37	151.30	1.47	65.30	65.30
$\beta_5^{53}-\beta_3^{53}$	38.38	148.87	1.49	57.15	57.15
$\beta_6^{53}-\beta_1^{53}$	36.91	147.15	1.51	46.32	46.32
$\langle\beta^{53}-\beta^{53}\rangle$	38.22			56.26	56.26
<i>Other possible connections</i>					
$\alpha_4^{84}-\beta_2^{82}$	33.20	13.04	-1.65	41.93	64.55
$\alpha_5^{84}-\beta_3^{82}$	31.66	10.21	-1.75	28.02	43.19
$\alpha_6^{84}-\beta_1^{82}$	32.16	29.92	-1.86	27.18	41.86
$\langle\alpha^{84}-\beta^{82}\rangle$	32.34			33.71	49.85
$\alpha_4^{84}-\alpha_3^{84}$	31.57	76.12	1.34	47.52	47.52
$\alpha_5^{84}-\alpha_1^{84}$	29.83	96.98	1.45	29.19	29.19
$\alpha_6^{84}-\alpha_2^{84}$	31.18	98.73	1.47	36.62	36.62
$\langle\alpha^{84}-\alpha^{84}\rangle$	30.86			37.77	37.77
$\beta_4^{82}-\alpha_2^{84}$	32.64	10.94	-1.72	53.49	34.74
$\beta_5^{82}-\alpha_3^{84}$	32.81	11.96	-1.63	61.36	39.85
$\beta_6^{82}-\alpha_1^{84}$	31.60	29.28	-1.89	36.53	23.73
$\langle\beta^{82}-\alpha^{84}\rangle$	32.35			50.46	32.77

Distance: Distance between the donor acceptor mass centers, Angle: Measured between the dipolar moments, Kappa: Geometric factor, 1/ k_{DA} : Donor–Acceptor transfer rate, 1/ k_{AD} : Acceptor–Donor transfer rate. The identity of the hexamers of the PC–PC complex is indicated by the roman numbers in superscripts: I for the upper hexamer and II for the lower hexamer.

These effects may be additive considering that the PC–PC complex is the result of a docking procedure.

The analysis of the energy transfer constants suggests two main intra-phycocyanin pathways: $\beta_3^{82} \rightarrow \alpha_1^{84} \rightarrow \alpha_5^{84} \rightarrow \beta_6^{82}$ and $\beta_3^{53} \rightarrow \beta_5^{53}$ (these pathways are reproduced in each third of the hexameric ring in equivalent subunits). Two preferential

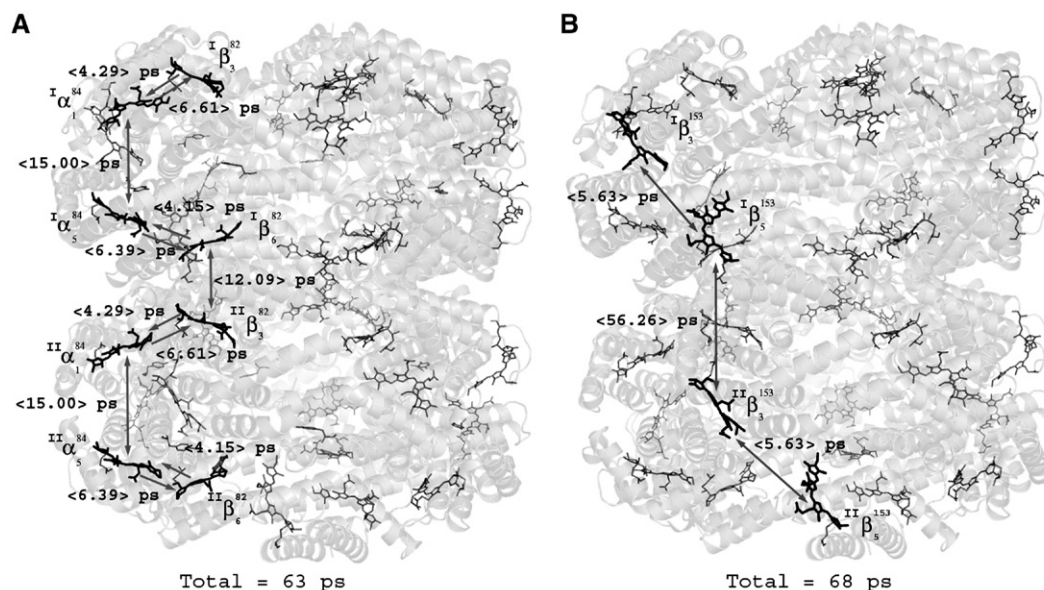


Fig. 5. Energy transfer pathways in a PC–PC complex. A) Representative internal energy transfer pathway. B) Representative external energy transfer pathway. The protein is shown as a transparent matrix in which the chromophores are represented as sticks in different shades of grey in the three dimensional context. The darker chromophores show the pathways. The average acceptor–donor transfer rates for each pair of chromophores are indicated.

energy transfer pathways from one PC hexamer to the next are also described $I\beta_6^{82} \rightarrow II\beta_3^{82}$ and $I\beta_5^{153} \rightarrow II\beta_3^{153}$. These pathways are indicated on Fig. 5. The total average transference time of the internal and external preferential pathways shown in Fig. 5 is 63 ps and 68 ps respectively. Experimental values in the range of 1 ps to 20 ps for the excitation transfer between trimers and 45 to 130 ps between hexamers in a rod have been reported [15,20,46,47]. In addition, calculated values using comparable approaches in other C-PC show a similar ps time-scale [14,16].

Most of the calculations performed with phycocyanin hexamers indicate that the transfer between trimers in one phycocyanin ring occurs through α^{84} and identify β^{82} as the donor between two PC hexamers. A complementary external pathway can be also described through β^{153} . As the chromophore groups are distributed along the antenna in the biological structure, every chromophore will receive light continuously either from other chromophores or from the environment, which validates the pathways through β^{153} .

4. Conclusions

Literature describes the analysis of the energy transfer pathways using heterodimers ($\alpha\beta$) trimers ($\alpha\beta$)₃ or subcomplexes of phycobilisomes. In cases where the hexamer was used, it was built using crystallographic symmetry. In this article, the hexameric structure of phycocyanin from *G. chilensis* was solved experimentally. As the asymmetric unit was the hexamer, it was possible to detect slight differences between equivalent subunits, representing more accurately the biological functional unit.

The structure allowed to build a reliable model of the PC–PC complex, a minimum unit of a rod in phycobilisomes and to

describe the light transfer pathways along the rod. The theoretical approach used the Förster equation, previously validated for monomers and trimers, was applied to the higher complex PC–PC, describing two main transfer pathways: An internal pathway of 63 ps that involves β^{82} and α^{84} and an external of 68 ps that involves β^{153} .

The existence of two preferential independent pathways, which repeat three times within the complex, explains the high efficiency of the energy transfer in the phycobilisome. This assures that every chromophore that absorbs light has an acceptor, minimizing energy loss, constituting one of the designs of nature that could be imitated for biotechnological purposes.

Acknowledgements

We thank Jorge L. Ríos for his help with the data collection. This work was supported by Dirección de Investigación, Universidad de Concepción, DIUC Grant N° 205.036.002-1.0.

References

- [1] A.N. Glazer, Phycobilisomes, structure and dynamics, *Annu. Rev. Microbiol.* 36 (1982) 173–198.
- [2] C. Lipschutz, E. Gantt, Association of Phycoerythrin and Phycocyanin: in vitro formation of a functional energy transferring phycobilisome complex of *Porphyridium sordidum*, *Biochemistry* 20 (1981) 3371–3376.
- [3] D. Lundell, A.N. Glazer, Molecular architecture of a light harvesting antennae. Core substructure in *Synechococcus* 6301 phycobilisomes: two new allophycocyanins and allophycocyanin B complexes, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 902–908.
- [4] A. Ducret, W. Sidler, E. Wehrli, G. Frank, R. Huber, Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidiscoidal phycobilisome type from the cyanobacteria *Anabaena* sp PCC7120, *Eur. J. Biochem.* 236 (1996) 1010–1024.

- [5] N. Tandeau de Marsac, G. Cohen-Bazire, Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74 (4) (1977) 1635–1639.
- [6] M. Bunster, J. Tellez, A. Candia, Characterization of phycobiliproteins present in *Gracilaria chilensis*, *Bol. Soc. Chil. Quím.* 42 (1997) 449–455.
- [7] C. Contreras-Martel, J. Martínez-Oyanedel, M. Bunster, P. Legrand, C. Piras, X. Venerde, J.C. Fontecilla-Camps, Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of a perfect hemihedral twinning, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 57 (2001) 52–60.
- [8] M. Duerring, G.B. Schmidt, R. Huber, Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of constitutive C-phycoerythrin from the chromatically adapting cyanobacterium, *Fremyella diplosiphon* at 1.6 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 217 (1991) 577–592.
- [9] X.-Q. Wang, L.-N. Li, W.R. Chang, D.C. Liang, Structure of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 57 (2001) 784–792.
- [10] N. Adir, Y. Dobrovetsky, N. Lerner, Structure of c-phycoerythrin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 Å: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly, *J. Mol. Biol.* 313 (2001) 71–81.
- [11] N. Adir, R. Vainer, V. Lerner, Refined Structure of C-phycoerythrin from the Cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 1.6 Å: insights in the role of solvent molecules in thermal stability and co-factor structure, *Biochim. Biophys. Acta* 1556 (2002) 168–174.
- [12] J. Nield, P.J. Rizkallah, J. Barber, N.E. Chayen, The 1.45 Å three dimensional structure of C-phycoerythrin from the thermophilic Cyanobacterium *Synechococcus elongatus*, *J. Struct. Biol.* 141 (2003) 149–155.
- [13] W.R. Chang, T. Jiang, Z.L. Wang, Z.X. Yang, D.C. Liang, Crystal structure of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata* at 2.0 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 262 (1996) 721–731.
- [14] B. Stec, R.F. Troxler, M.M. Teeter, Crystal structure of C-phycoerythrin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly, *Biophys. J.* 76 (1999) 2912–2921.
- [15] J. Zhang, F. Zhao, X. Zheng, H. Wang, Direct measurement of excitation transfer dynamics between two trimers in C-phycoerythrin hexamer from Cyanobacterium *Anabaena variabilis*, *Chem. Phys. Lett.* 304 (1999) 357–364.
- [16] A.A. Demidov, A.Y. Borisov, Computer simulation of energy migration on C-phycoerythrin of the blue green algae *Agmenellum quadruplicatum*, *Biophys. J.* 64 (1993) 1375–1384.
- [17] S.A. Pizarro, K. Sauer, Spectroscopic study of the Light harvesting protein C-phycoerythrin associated with colorless linker peptides, *Photochem. Photobiol.* 73 (2001) 556–563.
- [18] T. Förster, in: M. Florkin, E. Stotz (Eds.), *Comprehensive Biochemistry, Mechanism of Energy Transfer*, vol. 2, Elsevier, Amsterdam, 1967, pp. 261–280.
- [19] M.-P. Debreczky, K. Sauer, J. Zhou, D.A. Bryant, Comparison of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phycoerythrin, 1. Monomers, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 8412–8419.
- [20] M.-P. Debreczky, K. Sauer, J. Zhou, D.A. Bryant, Comparison of calculated and experimentally resolved rate constants for excitation energy transfer in C-phycoerythrin, 2. Trimers, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 8420–8431.
- [21] E. Gantt, C.A. Lipschutz, Phycobilisomes from *Porphyridium cruentum*, *J. Cell Biol.* 54 (1972) 313–324.
- [22] W. Kabsch, Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 795–800.
- [23] M. Rossmann, The molecular replacement method, *Acta Crystallogr., A* 46 (1990) 73–82.
- [24] J. Navaza, AmoRe: an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr., A* 50 (1994) 157–163.
- [25] A.T. Brunger, P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. Delano, P. Gros, R.W. Grosse-Kuntzle, J.-S. Jiang, J. Kuszewski, N. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, G.L. Warren, Crystallography and NMR System (CNS): a new software system for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr., D Biol. Crystallogr.* 54 (1998) 905–921.
- [26] A. Roussel, C. Cambillau, Silicon Graphics Geometry Partners Directory, The Turbo-Frodo Graphics Page, Silicon Graphics, Mountain View, CA, USA, 1991.
- [27] R. Laskowsky, M. McArthur, D. Moss, J. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Crystallogr.* 26 (1993) 283–291.
- [28] R. Chen, Z. Weng, Docking unbound proteins using shape complementarity, desolvation and electrostatics, *Proteins* 47 (2002) 281–294.
- [29] R. Chen, L. Li, Z. Weng, ZDOCK: an initial stage protein docking algorithm, *Proteins* 52 (2003) 80–87.
- [30] A. Archarov, V. Govorum, A. Dubanov, Y. Ivanov, A. Veselovsky, P. Lewi, O. Jansen, Protein–protein interactions as a target for drugs in proteomics, *Proteomics* 3 (2003) 380–391.
- [31] B. Ma, T. Elkayam, H. Wolfson, R. Nussinov, Protein–protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 5772–5777.
- [32] B. Vallone, A. Miele, P. Vecchini, E. Chiancone, M. Brunori, Free energy of burying hydrophobic residues in the interface between protein subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 6103–6107.
- [33] S. Jones, J.M. Thornton, *Progress in Biophysics and Molecular Biology, Protein–Protein Interactions: A Review of Protein Dimer Structures*, vol. 63, 1995, pp. 31–165, <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/index.html>.
- [34] I.K. McDonald, J.M. Thornton, Satisfying hydrogen bonding potential in proteins, *J. Mol. Biol.* 238 (1994) 777–793.
- [35] W.L. Jorgensen, J. Tirado-Rives, The OPLS force field for proteins. Energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1657–1666.
- [36] W.F. Van Gunsteren, P.H. Hünenberger, A.E. Mark, P.E. Smith, I.G. Tironi, Computer simulation of protein motion, *Comput. Phys. Commun.* 91 (1995) 305–319.
- [37] J. Grabowsky, E. Gantt, Photophysical properties of phycobiliproteins from phycobilisomes: fluorescent lifetimes quantum yields and polarization spectra, *Photochem. Photobiol.* 28 (1978) 39–45.
- [38] F.J. Kleima, E. Hofmann, B. Gobets, I.H. van Stokkum, R. Grondelle, K. Diederichs, H. van Amerongen, Förster energy transfer in peridinin-chlorophyll-a-protein, *Biophys. J.* 78 (1) (2000) 344–353.
- [39] K.E. Apt, J.E. Collier, A.R. Grossman, Evolution of phycobiliproteins, *J. Mol. Biol.* 248 (1995) 79–96.
- [40] A.R. Matamala, D.E. Almonacid, M.F. Figueroa, J. Martínez-Oyanedel, M.C. Bunster, A Semiempirical Approach to the Intra-Phycocyanin and Inter-Phycocyanin FRET Pathways in Phycobilisomes, *J. Comput. Chem.* (2006) Manuscript accepted.
- [41] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, Gaussian 98, Revision A.7, Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- [42] W. Reuter, G. Wiegand, R. Huber, M. Than, Structural analysis at 2.2 Å of orthorhombic crystals presents the asymmetry of allophycocyanin-linker complex AP-L_C^{7,8}, from phycobilisomes from *Mastigocladus laminosus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 1363–1368.
- [43] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403–410.
- [44] J. Martínez-Oyanedel, C. Contreras-Martel, C. Bruna, M. Bunster, Structural-functional analysis of the oligomeric protein R-phycoerythrin, *Biol. Res.* 37 (2004) 733–745.

- [45] C.J. Camacho, Modeling side-chains using molecular dynamics improve recognition of binding region in CAPRI targets, *Proteins* 60 (2005) 245–251.
- [46] A.R. Holzwarth, J. Wendler, G.W. Suter, Studies on chromophore coupling in isolated phycobiliproteins: II. Picosecond energy transfer kinetics and time resolved fluorescence spectra of C-phycocyanin from *Synechococcus* 6301 as function of the aggregation state, *Biophys. J.* 51 (1987) 1–12.
- [47] A.R. Holzwarth, Structure-function relationships and energy transfer in phycobiliprotein antennae, *Physiol. Plant.* 83 (1991) 518–528.

In situ* photoacoustic spectroscopy of phycobiliproteins in *Gracilaria chilensis

R. Saavedra¹, M. Figueroa², T. Wandersleben², L. Pouchucq², J.E. Morales¹, M. Bunster² and A. Cruz-Orea³

¹*Departamento de Física, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile*

²*Laboratorio de Biofísica Molecular, Depto. Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile*

³*Departamento de Física, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, A.P. 14-740, CP 07360, Mexico DF, Mexico*

Abstract. Phycobiliproteins, the main polypeptidic components of the phycobilisomes (PBS), are biological macromolecules arranged in complex interaction systems to perform light harvesting and conduction. The optical properties of these systems can hardly be studied by conventional spectroscopic techniques. Furthermore this techniques also involve laborious chemical extraction methods. Photoacoustic (PA) spectroscopy was successfully applied to an *in situ* study of the phycobiliproteins expression in the eukaryotic red algae: *Gracilaria chilensis*.

1. INTRODUCTION

Phycobiliproteins are water soluble chromoproteins found in cyanobacteria and eukaryotic red algae. The phycobiliproteins have bilins covalently attached, which are open-chain tetrapyrroles and they absorb the light in the visible region of the spectrum. The phycobiliproteins are organized in subcellular light-harvesting complex called phycobilisomes (PBS). These structures allow to the phycoproteins to be arranged geometrically in a such manner which that optimize the capture of light and transfer of energy. They absorb energy in portions of the visible electromagnetic spectrum that are poorly utilized by chlorophyll. The PBS contain phycobiliproteins which are divided into three classes based on the position of their absorption bands: R-phycoerythrin (R-PE), phycocyanin (PC), and allophycocyanins (APC). The optical absorption maxima for these phycobiliproteins are 566 nm for R-PE, 621 nm for C-PC and 651 nm for APC [1, 2]. The photoacoustic spectroscopy (PAS) technique has been used in a variety of materials [3–7]. In this work photoacoustic spectroscopy (PAS) was applied to investigate the phycobiliproteins expression in an eukaryotic red algae: *Gracilaria chilensis*.

2. MATERIAL AND METHODS

Optical absorption spectra were recorded with a homemade photoacoustic spectrometer. A chopper and monochromator were placed at the output of a 250 W QTH lamp to obtain modulated light at a given wavelength. The samples enclosed in an aluminium PA cell were illuminated within visible range output (400 - 750 [nm]). The produced PA signal was detected by a commercial electret microphone and processed by using a preamplifier and a lock-in amplifier. All the spectra were recorded at room temperature with the optical chopper set at 22 Hz. The samples were randomly selected from algae apexes. The apexes of *Gracilaria chilensis* were collected from Pacific Ocean coast at the Coliumo Bay,

in VIII region, Chile. During 4 weeks, the algae apexes were grown in laboratory culture conditions and controlled illumination. Commercially purified phycobiliproteins were not available at the moment; thus, a protein extraction method was utilized to obtain purified PBS and phycobiliproteins also from culture algae apex. The quantification of the extracted amount of phycobiliproteins was calculated from absorbance data [8]. *In situ* PA absorption spectra of the alga and PA transmittance for PBS and phycobiliproteins spectra were also recorded [5].

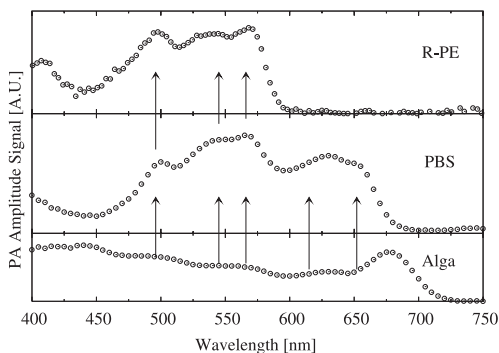


Figure 1. Absorption spectrum of *in situ* alga cuttings (bottom), transmission spectrum of extracted PBS (middle), transmission spectrum of extracted R-PE (top).

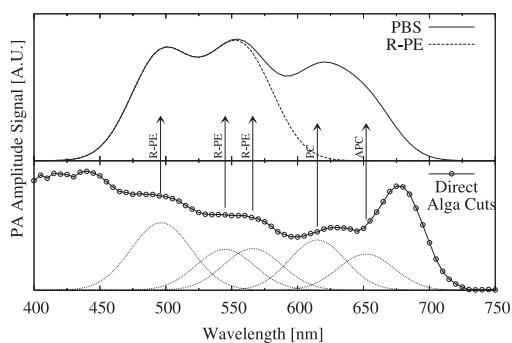


Figure 2. PA spectrum analyzed on Gaussian components: Spectral fitting by Gaussian Peak Deconvolution (bottom). PBS spectra after background subtraction and R-PE resolved spectra.

3. RESULTS

The PA spectroscopic measurements of algae cultures are shown in figure 1. The *in situ* optical absorption spectra of the red alga is characterized by a high absorption in the blue (400-500 [nm]) and in the red (600-700 [nm]) spectral region, caused by a light-harvesting complex containing chlorophyll and carotenoids. It is apparent that the light absorption is increased in the green - yellow spectral region (500-600 [nm]) due to the presence of PBS. PBS absorption has a strong band, related to PC and APC but mainly to PE that absorbs green light. The PA spectra do not differ strongly from the spectroscopic results [1, 2]. The PBS and phycobiliproteins are directly identified by its absorption spectra. These results show the influence of the algae structure and its optical properties on the PA signal. The spectroscopic bands of PBS overlap with other optically active bands, such as chlorophyll and carotenoids. It is obvious that it is quite difficult distinguish single or even groups of phycobiliproteins. From "raw" alga PA spectrum, spectral fitting was done. It was possible to solve the band overlapping using gaussian peak deconvolution, after carotenoids and chlorophyll band subtraction. Figure 2 shows an example of sample analyzed on Gaussian components [6, 7]. A number of peaks in different combinations fill the spectral range from 400 to 750 nm. Thus the PBS spectrum can be decompose conveniently in phycobiliproteins groups according to specific bands. The same band structure is resolved despite small differences in relative heights. Quantitative assessment of phycobiliproteins were achieved by optical spectroscopy. The maximum absorption bands are useful as an attempt to quantify the protein expression. The relative amplitude ratio at 620 nm was calculated [9] (Table 1).

Table 1. Expression of Phycobiliproteins inspected by Photoacoustic Spectroscopy

Concentration $\frac{mg}{mL}$	Phycobiliproteins (Max. Abs. in [nm])		
	R-PE (566)	C-PC (621)	APC (651)
Absorbance	0.44	0.37	0.35
Relative absorbance ratio at 620 nm	1.2	1.0	0.94
PAS signal amplitude	0.0504	0.0429	0.0438
Relative PAS signal amplitude ratio at 620 nm	1.17	1.00	1.02
Gaussian peak height	0.029	0.035	0.0252
Relative Gaussian peak height ratio at 620 nm	0.83	1.00	0.72

4. DISCUSSION

In spite of the diversity and complexity of the red algae pigment composition the three main groups can be photoacoustically defined in accordance with conventional techniques [2]. The key problem for optical methods is still the data quantification. However, this type of study does not aim to determine absolute value but only relative values as function of the wavelength. Observation of bands is very helpful as they show directly the relative expression of the phycobiliproteins in the algae cultures. PA methods are more variable and less sensitive compared to fluorimetric techniques. Continuous cultures can combine the effects of light and nutrient limitation which complicate the interpretation of data acquired *in situ*. PAS can provide *in situ* insights into algal pigment adaptation studies and validate photoacclimation models, in contrast with the time consuming protein extraction methods, fluorimetric and optical spectroscopic techniques.

Acknowledgements

R. Saavedra is grateful to Dirección de Investigación, Universidad de Concepción, for partial support of this work (Grant # 201.011.031-1).

References

- [1] R. MacColl and D. Guard-Friar Phycobiliproteins. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida (1987).
- [2] A. Glazer Journal Bio. Chem, **264**, 1 (1989).
- [3] A. Rosencwaig Science, **181**, 657 (1975).
- [4] H. Vargas and L.C.M. Miranda Phys. Rep. **2**, 43 (1988).
- [5] M.V. Marquezini et al. Meas. Sci. Technol. **2**, 396 (1991).
- [6] P. Nandakumar et al. Solid State Commun. **106**, 193 (1998).
- [7] D.R. dos Santos et al. Rev. Sci. Instrum. **74**, 355 (2003).
- [8] M. Bunster et al. Boletín de la Sociedad Chilena de Química. **42**, 449 (1997).
- [9] E. Miskiewicz et al. Plant Physiol. **130**,1414 (2002).