Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Mutagénesis del dominio PH de la fosfolipasa C-δ1

Tesis que presenta

Javier Adrian Morales Morales

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

Diciembre, 2014

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Mutagénesis del dominio PH de la fosfolipasa C-δ1" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez

Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Diciembre del 2014.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:

Javier Adrian Morales Morales

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Estudio funcional de la unión entre fibrilirina y fosfolípidos de inositol involucrados en la síntesis de ARN ribosomal" bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna (proyecto 176598).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero a través del proyecto de Ciencia Básica 176598 con título: "Estudio funcional de la unión entre fibrilirina y fosfolípidos de inositol involucrados en la síntesis de ARN ribosomal" con número 176598 y por la beca con número de apoyo 340318.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por las facilidades para la realización de este proyecto, en especial a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y a todo el personal del CICY.

A los miembros de mi comité tutoral, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dra. Ana Luisa Ramos Díaz, Dr. Víctor Manuel Suárez Solís (Q.E.P.D.), por el valioso tiempo que dedicaron a mi formación y las importantes contribuciones que ofrecieron a este trabajo.

A mi comité revisor, Dra. Sara Elena Solís Pereira y Dr. Ignacio Islas Flores, por los valiosos comentarios y sugerencias aportados para la realización de este documento de tesis.

A los técnicos, Ing. Wilma Aracely González Kantún y M. C. Ángela Kú González, por apoyo técnico en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 23, Cecilia Aquino, Marisol Saenz, Ulises Rodriguez y Lloyd Loza, a quienes les agradezco su amistad y los momentos de diversión.

Finalmente, quiero agradecer al Dr. Enrique Castaño de la Serna que me ha apoyado en todos los momentos durante la realización de esta tesis con sus consejos y con su paciencia guiándome durante todo este proceso.

DEDICATORIAS

A mis padres, especialmente a mi madre Carmen por su amor y su apoyo incondicional y su confianza en mí a pesar de la distancia.

A mis hermanos, David y Nayeli por todos lo que hemos vivido.

A Gloria, por creer siempre en mí y por la vida que nos espera juntos.

A todos aquellos que me han apoyado incondicionalmente a lo largo del camino.

ÍNDICE

Listado de figuras v

Listado de cuadros vii

ABREVIATURAS ix

RESUMEN xiii

ABSTRACT xv

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I 3

ANTECEDENTES 3

1.1 FOSFOINOSÍTIDOS 3

1.1.1 FOSFATIDILINOSITOL 3-MONOFOSFATO (PI(3)P) 5

1.1.2 FOSFATIDILINOSITOL 4-MONOFOSFATO (PI(4)P) 7

1.1.3 FOSFATIDILINOSITOL 5-MONOFOSFATO (PI(5)P) 8

1.1.4 FOSFATIDILINOSITOL 3, 5-BISFOSFATO ($PI(3,5)P_2$) 8

1.1.5 FOSFATIDILINOSITOL 3, 4-BISFOSFATO ($PI(3,4)P_2$) 10

1.1.6 FOSFATIDILINOSITOL 3, 4, 5-TRISFOSFATO ($PI(3,4,5)P_3$) 10

1.1.7 FOSFATIDILINOSITOL 4, 5-BISFOSFATO ($PI(4,5)P_2$) 11

1.2 HERRAMIENTAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LOS FOSFOINOSÍTIDOS 12

1.3 DOMINIOS DE INTERACCIÓN CON FOSFOINOSÍTIDOS 13

1.4 FOSFOLIPASA C 14

1.5 PLC-δ 16

1.5.1 PLC-δ1 17

1.5.2 Dominio PH de PLC-δ1 19

1.5.3 El dominio PH de la PLC-δ1 como herramienta bioquímica 21

HIPÓTESIS 24

OBJETIVO GENERAL 24

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24

JUSTIFICACIÓN 24

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 25

BIBLIOGRAFÍA 27

CAPÍTULO II 37

MATERIALES Y MÉTODOS 37

2.1 Elección de los aminoácidos a mutar 37

2.2 Mutagénesis directa por extensión solapada 37

2.3 Mutagénesis de plásmido completo 39

2.4 Diseño de iniciadores 40

2.7 Purificación de los dominios 41

2.8 Inmunodetección de los dominios silvestre y mutantes 42

2.9 Ensayo de interacción de los dominios silvestre y mutantes con fosfolípidos 43

BIBLIOGRAFÍA 44

CAPÍTULO III 45

RESULTADOS 45

3.1 SELECCIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS A MUTAR. 45

3.2 DISEÑO DE INICIADORES 48

3.3 RECUPERACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON LAS SECUENCIAS DE LOS DOMINIOS PH DE LA PLC-δ1 SILVESTRE Y MUTANTE R40A. 49

3.4 PURIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS PH DE LA PLC-δ1 SILVESTRE Y MUTANTE (MUT) (W40A) 50

3.5 MUTAGÉNESIS DEL PLÁSMIDO COMPLETO DEL DOMINIO PH DE LA PLC-δ1 52

3.6 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS MUTANTES K30A, W36F Y W36Y 57

3.7 INMUNODETECCIÓN DE LOS DOMINIOS SILVESTRE Y MUTANTES 58

3.8 FAT BLOT DE LOS DOMINIOS PH SILVESTRE Y MUTANTES 61

CAPITULO IV 63

DISCUSIÓN 63

5.2. MUTANTE K30A 64

5.2. MUTANTE W36F 66

5.2. MUTANTE W36Y 67

CONCLUSIONES 70

PERSPECTIVAS 71

BIBLIOGRAFIA 72

ANEXOS 75

MUTAGÉNESIS SITIO-ESPECIFICA DEL DOMINIO PH DE LA PLC-δ1 75

LIGACIÓN DE LAS SECUENCIAS MUTANTES EN EL VECTOR DE CLONACIÓN PGEM-T EASY 76

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Organización de fosfatidil inositol 4, 5 bisfosfato en las membranas biológicas. 3

Figura 1.2. Existen siete especies de fosfoinosítidos. 5

Figura 1.3. Dominios que se unen a los fosfoinosítidos. 14

Figura 1.4. Activación y función de varias isoenzimas de PLC en mamíferos 16

Figura 1.5. Las familias de fosfolipasas C (PLC) se clasifican según las estructuras que poseen. 17

Figura 1.6. Estructura básica del dominio PH. 20

Figura 1.7. Diagrama experimental. 26

Figura 2.1. Esquema general de la mutagénesis por extensión solapada. 38

Figura 2.2. Esquema general de la mutagénesis del plásmido completo. 40

Figura 3.1. Alineamiento de secuencias de distintos dominios PH hecho con el método MUSCLE. 46

Figura 3.2. Modelo tridimensional del dominio PH de la PLC-δ1 unido al IP_3. 47

Figura 3.3. Recuperación de los plásmidos con los dominios PH silvestre y mutante R40A. 50

Figura 3.4. Purificación de los dominios PH silvestre y mutante R40A. 51

Figura 3.5. Optimización del $MgSO_4$ para la mutagénesis del plásmido completo. 52

Figura 3.6. Comprobación de la amplificación de plásmido completo para obtener la mutante K30A. 53

Figura 3.7. Recuperación del plásmido con la secuencia del dominio PH mutante K30A. 54

Figura 3.8. Digestión del plásmido con la secuencia del dominio PH mutante K30A. 55

Figura 3.9. PCR de los plásmidos con la secuencia del dominio PH mutante K30A. 56

Figura 3.10. Alineamiento de secuencias con los dominios PH silvestre y mutantes. 56

Figura 3.11. Purificación de los dominios PH silvestre y mutantes K30A, W36F y W36Y. 58

Figura 3.12. Inmunodetección de los dominios PH silvestre y mutantes en extracto crudo de proteínas. 59

Figura 3.13. Inmunodetección de los dominios PH silvestre y mutantes en extracto purificado de proteínas. 60

Figura 3.14. Determinación de la especificidad de los dominios silvestre y mutantes mediante ensayos de Fat blot 62

Figura 4.1. Posición de la lisina 30 del dominio PH de la PLC-δ1 con respecto al anillo de inositol. 65

Figura 4.2. Posición del triptófano 36 del dominio PH de la PLC-δ1 con respecto al anillo de inositol 67

Figura 4.3. Posición del triptófano 36 del dominio PH de la PLC-δ1 con respecto al anillo de inositol. 68

Figura A1. PCRs 1 y 2 para obtener los fragmentos de las mutantes 2-8. 75

Figura A2. PCRs 3 para obtener las mutantes completas. 76

Figura A3. Recuperación del plásmido con la secuencia del dominio PH mutante K30R.. 77

Figura A4. Digestión del plásmido con la secuencia del dominio PH mutante K30R. 78

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Proteínas con dominios PH capaces de unirse a más de una especie fosfoinositida. 21

Cuadro 2.1. Programación del termociclador para la mutagénesis por extensión solapada. 39

Cuadro 2.2. Programación del termociclador para la mutagénesis de plásmido completo. 40

Cuadro 3.1. Secuencias utilizadas para el alineamiento de secuencias hecho con el programa Mega 5.1 45

Cuadro 3.2. Aminoácidos seleccionados para reemplazo por medio de mutagénesis dirigida por PCR y aminoácidos por los que serán sustituidos 48

Cuadro 3.3. Iniciadores diseñados para realizar las mutaciones 49

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
AtMTM1	miotubularina mitocondrial de *Arabidopsis thaliana*
ATX-1	factor tipo tritórax de *Arabidopsis thaliana*
Canales Kir	canales de rectificación entrante de potasio
CHMP	proteínas del cuerpo multivesicular cargado
DAG	diacilglicerol
Dominio PH	dominio de homología a pleckstrina
EGFR	factor de crecimiento epidérmico
FAB1p	proteínas de células de formas haploides y binucleadas
FAP1	fosfatasa asociada a fas
Dominio FYVE	dominio Fab1, YOTB, Vac1 y EEA1,
GFP	proteína verde fluorescente
GST	glutatión S transferasa
His6	hexahistidina
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
IP_3	inositol 1,4,5 trisfosfato

IP_6	inositol 1,2,3,4,5,6 hexafosfato
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
kDa	kilodaltones
kb	kilobases
P70S6k	cinasa S6p70 ribosomal
PA	ácido fosfatídico
Pb	pares de pases
PBS	amortiguador fosfato salino
PBS-T	amortiguador fosfato salino más tween 20
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDZ	proteína de densidad postsináptica
PKC	proteína cinasa C
PLC	fosfolipasa C
PI(3)P	fosfatidilinositol 3 fosfato
PI(4)P	fosfatidilinositol 4 fosfato
PI(5)P	fosfatidilinositol 5 fosfato
$PI(3,4)P_2$	fosfatidilinositol 3, 4 bisfosfato
$PI(3,5)P_2$	fosfatidilinositol 3, 5 bisfosfato
$PI(4,5)P_2$	fosfatidilinositol 4, 5 bisfosfato
$PI(3,4)P_3$	fosfatidilinositol 3, 4, 5 trisfosfato

$PI(4,5)P_2$	fosfatidilinositol 4, 5 bisfosfato
$PI(3,4,5)P_3$	fosfatidilinositol 3, 4, 5 trisfosfato
PIPs	fosfoinositidos
PIPTs	proteínas transportadoras de fosfatidilinositol
SDS-PAGE	gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.
ZO-2	zonula ocludens tipo 2

RESUMEN

Los fosfoinosítidos son derivados del fosfatidilinositol y son conocidos por ser segundos mensajeros en distintas vías de señalización celular. A través de las proteínas que interactúan con ellos directamente, participan en procesos como la diferenciación celular, la respuesta a diferentes tipos de estrés, la transcripción de genes y la remodelación de la cromatina.

A pesar del conocimiento que se tiene de los fosfoinosítidos, el mecanismo por el que ellos intervienen en estas funciones, particularmente aquellas que se desarrollan en el núcleo celular, no es del todo claro ya que no existen herramientas adecuadas para estudiarlos.

La fosfolipasa C-δ1 (PLC-δ1) es una enzima cuya función es hidrolizar al $PI(4,5)P_2$ en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trisfosfato (IP_3). El dominio de homología a pleckstrina o PH de la PLC-δ1 se encarga de reconocer y unirse al $PI(4,5)P_2$ y por este motivo ha sido ampliamente utilizado para estudiar a éste fosfoinosítido.

En este trabajo se modificó la estructura primaria de dicho dominio a través de la mutagénesis sitio especifica de plásmido completo con el fin de modificar la especificidad del dominio por los fosfoinosítidos.

Se logró obtener tres mutantes, K30A, W36F y W36Y que fueron expresadas y purificadas para posteriormente analizar su especificidad mediante la técnica de Fat blot. Las mutantes obtenidas presentaron especificidades diferentes comparadas con el dominio PH silvestre y entre ellas.

El dominio PH K30A reconoció al $PI(4,5)P_2$, al $PI(3,5)P_2$ y más débilmente al $PI(3,4,5)P_3$. El dominio PH mutante W36F se unió a los siete fosfoinosítidos y al ácido fosfatídico (PA). finalmente El dominio PH mutante W36Y parece interactuar con PA y con todos los fosfoinosítidos menos el PI(3)P y esta unión parece ser más intensa en el caso del PI(5)P, el $PI(4,5)P_2$ y el $PI(3,4,5)P_3$.

ABSTRACT

Phosphoinositides are phosphatidylinositol derived, well known to be second messengers in various cell signaling pathways. However through proteins that interact directly with them, they could participate in processes such as cell differentiation, response to different types of stresses, gene transcription and chromatin remodeling.

Despite this, the mechanism by which phosphoinositides are involved in these functions, particularly those that take place in the cell nucleus is unclear because there are no adequate tools to study them.

Phospholipase C-δ1 (PLC-δ1) is an enzyme whose function is to hydrolyze $PI(4,5)P_2$ in diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5 trisphosphate (IP_3). The pleckstrin homology domain of PLC or PH-δ1 is responsible for recognizing and binding to $PI(4,5)P_2$ and for this reason has been widely used to study this phosphoinositide.

In this work the primary structure of this domain was modified by site-specific of whole plasmid mutagenesis in order to modify the specificity for phosphoinositides.

We managed to obtain three mutants: K30A, W36F and W36Y which were expressed and purified for subsequent analysis by Fat blot specificity. We observed that the mutants had different specificity in contrast with the wild type domain and themselves..

Mutant domain K30A recognized $PI(4,5)P_2$, $PI(3,5)P_2$ and weakly $PI(3,5)P_2$. Mutant domain W36F recognized all the phosphoinositides and the Phospahtidic Acid (PA). Finally, mutant PH domain W36Y seems to interact with PA and all the other phosphoinositides, except PI(3)P.

INTRODUCCIÓN

Los fosfoinosítidos (PIPs) son fosfolípidos de membrana derivados del fosfatidilinositol (PI) que actúan en muchos procesos de transducción de señales y otros procesos fisiológicos (Echard, 2012).

Los hidroxilos de las posiciones 3, 4, y 5 del fosfatidilinositol pueden ser reversiblemente fosforilados, lo que da lugar a siete posibles polifosfoinosítidos: fosfatidil inositol 3-monofosfato (PI(3)P), fosfatidil inositol 4-monofosfato (PI(4)P), fosfatidil inositol 5-monofosfato (PI(5)P), fosfatidil inositol 3, 4-bisfosfato ($PI(3,4)P_2$), fosfatidil inositol 3, 5-bisfosfato ($PI(3,5)P_2$), fosfatidil inositol 4, 5-bisfosfato ($PI(4,5)P_2$), y fosfatidil inositol 3, 4, 5-trifosfato ($PI(3,4,5)P_3$) (Larsen *et al.*, 2003).

En animales el $PI(4,5)P_2$ es hidrolizado por la enzima fosfolipasa C (PLC) para formar diacilglicerol (DAG) e inositol 1,3,5-trisfosfato (IP_3) que funcionan como segundos mensajeros en la célula. DAG activa a la proteína cinasa C (PKC) y el IP_3 provoca la liberación de iones calcio de los almacenes intracelulares, lo que hace a la PLC una proteína reguladora del calcio intracelular (Runkel *et al.*, 2012).

Actualmente, existen muchas evidencias de la participación de este fosfoinosítido en diversas funciones celulares vía el reclutamiento de proteínas que tienen dominios de reconocimiento a los PIPs, como de la proliferación celular, el reclutamiento de proteínas en diversas vías de transducción de señal, la respuesta a estrés biótico y abiótico así como la dinámica del citoesqueleto, la migración y la polaridad celular y el tráfico vesicular en organismos eucariotas.

Recientemente, ha tomado especial relevancia el papel de los PIPs en los procesos que son llevados a cabo en el núcleo celular, por ejemplo, la transcripción de genes, la maduración de ARN y la exportación nuclear. Sin embargo el mecanismo por el que los PIPs participan en estas funciones no es claro (Lewis *et al.*, 2011; Di Paolo y De Camille, 2006).

En este trabajo se propuso modificar la estructura primaria del dominio PH de la PLC-δ1 para generar nuevas herramientas de estudio de los PIPs, obteniendo dominios mutantes

específicos para cada uno de ellos.

Fue posible obtener tres dominios mutantes con distintas especificidades hacia los fosfoinosítidos, demostrando que es posible modificar el dominio PH para crear las herramientas necesarias para discernir la manera en que los PIPs llevan a cabo sus funciones en los distintos procesos celulares en los que intervienen.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Fosfoinosítidos

Los fosfoinosítidos (PIPs) son ácidos lipídicos poco abundantes derivados del fosfatidil inositol. Estos se encuentran principalmente en la parte citosólica de la membrana plasmática y las membranas intracelulares. En las células de mamíferos representan alrededor del 1.5% de los fosfolípidos de la membrana plasmática mientras que en las membranas de las células vegetales su presencia es menor al 1% (Munnik, y Nielsen, 2011).

El PI es sintetizado en el retículo endoplásmico a partir del DAG e inositol y es enviado a la membrana respectiva, ya sea a través de transporte vesicular o por medio de la actividad enzimática de las proteínas transportadoras de fosfatidilinositol (PIPTs) (Cockcroft y Garner, 2011).

Los PIPs están integrados a las membranas celulares por las dos cadenas acilo del DAG, mientras que el anillo de inositol permanece en el citosol. (Larsen *et al.*, 2003), como lo ilustra la figura 1.1.

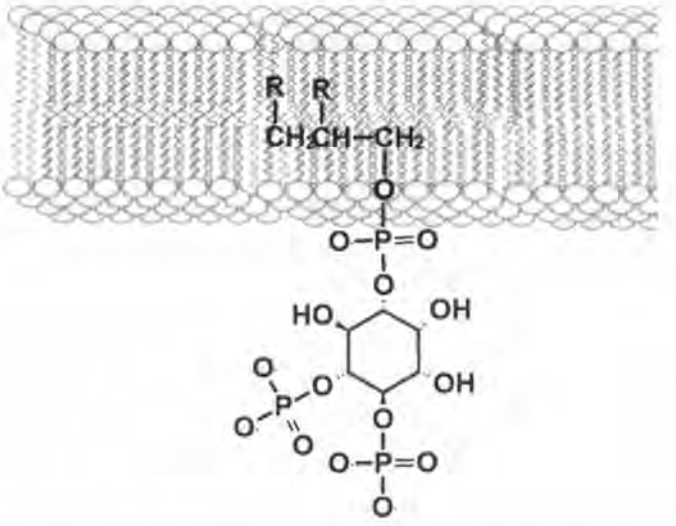


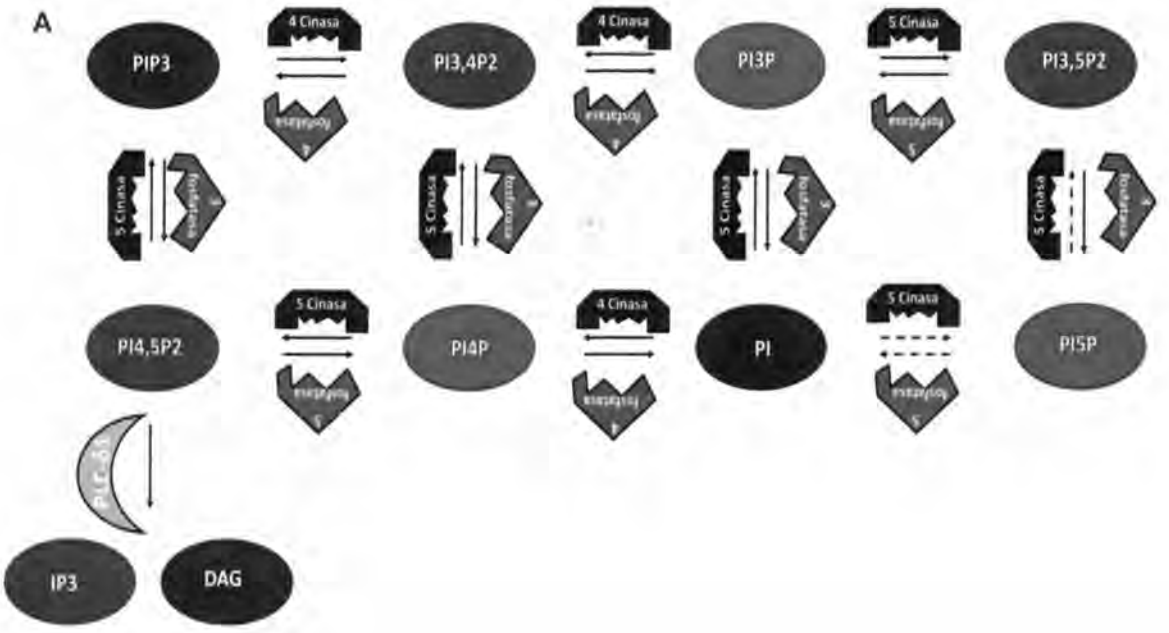
Figura 1.1. Organización de fosfatidil inositol 4, 5 bisfosfato en las membranas biológicas. El fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato, así como el resto de los fosfoinosítidos se asocian a las membranas

biológicas con su grupo apolar incrustado en ellas, mientras que la cabeza polar de inositol queda expuesta al medio acuoso.

En la figura 1.2 se ilustra como el mioinositol del fosfatidilinositol puede ser reversiblemente fosforilado en el hidroxilo en las posiciones 3, 4, y 5, lo que da lugar a siete posibles polifosfoinosítidos: fosfatidilinositol 3-monofosfato (PI(3)P), fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI(4)P), fosfatidilinositol 5-monofosfato (PI(5)P), fosfatidilinositol 3, 4-bisfosfato ($PI(3,4)P_2$), fosfatidilinositol 3, 5-bisfosfato ($PI(3,5)P_2$), fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato ($PI(4,5)P_2$), y fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato ($PI(3,4,5)P_3$).

La mayor parte del conocimiento que se tenía sobre los PIPs era relativo a sus funciones como precursores de segundos mensajeros. En la actualidad se sabe que en los mamíferos, los PIPs pueden controlar algunas funciones celulares, como la polaridad, la migración y la supervivencia celular.

Los PIPs también participan en la dinámica del citoesqueleto, el tráfico vesicular y en la identidad de las membranas celulares debido a que las especies de PIPs y la concentración de las mismas, varia de una membrana a otra (Echard. 2012).



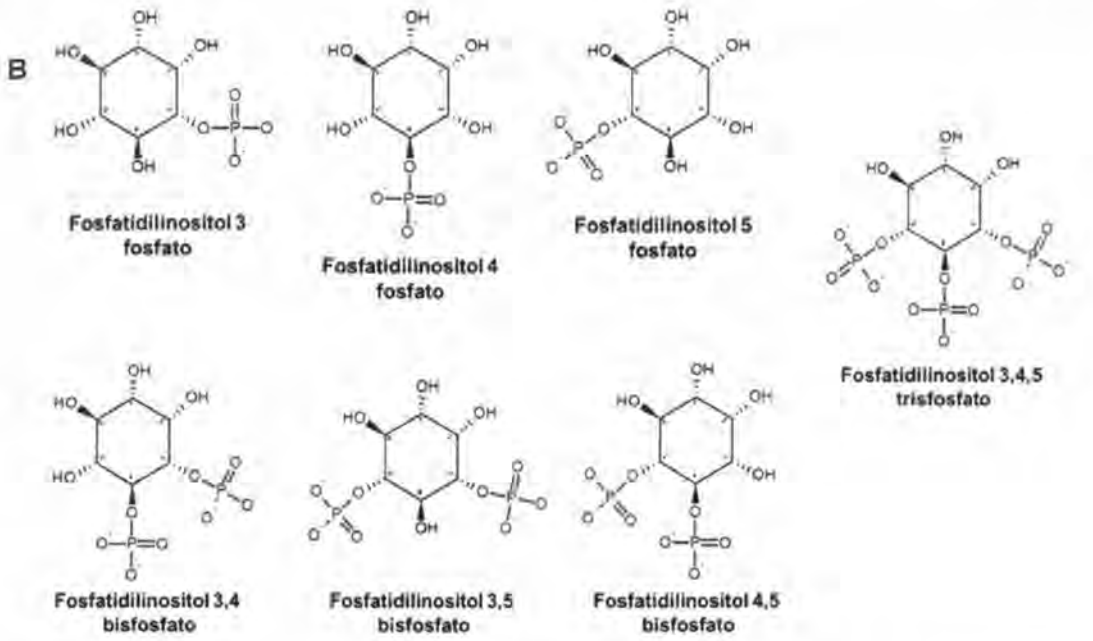


Figura 1.2. Existen siete especies de fosfoinosítidos. A) Metabolismo de los fosfoinosítidos. Las cinasas están representadas con flechas púrpuras y las fosfatasas con flechas rosa. Las flechas punteadas representan enzimas que aún no han sido encontradas (modificado de Echard. 2012). B) cabezas polares fosforiladas de las siete especies de fosfoinosítidos.

Lewis *et al.* (2011) mencionan algunas funciones que son llevadas a cabo en el núcleo en las que participan los PIPs, entre ellas el procesamiento del pre-RNAm, la expresión de genes y la remodelación de la cromatina, sin embargo el mecanismo por el que los fosfoinositidos participan en estas funciones no es claro (Lewis *et al.*, 2011; Di Paolo y De Camilli, 2006).

1.1.1 Fosfatidilinositol 3-monofosfato (PI(3)P)

El PI(3)P es sintetizado por la enzima fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K). En mamíferos la vía de señalización donde participa el PI(3)P está vinculada a una serie de importantes procesos celulares como la supervivencia celular linfocitaria, la proliferación y la diferenciación celular, así como la motilidad (Fruman y Bismuth, 2009). A su vez, el PI(3)P y los PIPs derivados de él, regulan diversos procesos celulares a través del reclutamiento de proteínas efectoras que contienen dominios de unión a PIPs (Zhang *et al.*, 2009).

El PI(3)P forma parte del andamiaje lipoproteico asociado con los autofagosomas y las vacuolas respectivamente (Boss e Im, 2012).

Petiot *et al.* (2003) reportaron que el transporte de membrana del endosoma temprano al tardío no depende del PI(3)P pero si ayuda a regularlo. El PI(3) controla estrechamente la función de clasificación que realizan los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de sus distintos ligandos (*e.g.*, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento tumoral alfa y la anfiregulina).

Falasca y Maffuci (2006) ponen de manifiesto el papel que podría tener el PI(3)P que se sintetiza en lugares distintos a la región endosómica como mediador en la vía de señalización de la insulina, específicamente en el transporte de la glucosa.

El PI(3)P tiene otras funciones tales como la regulación nutricional de la síntesis de proteínas y la diferenciación muscular mediada por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 o IGF-1 (Falasca y Maffuci, 2006).

En los seres humanos la regulación de la vía de señalización de este fosfoinosítido en células inmunes es crucial para la prevención de diversos tipos de cáncer derivados de leucocitos, así como el desarrollo de las enfermedades autoinmunes (Niedermeier *et al.*, 2009).

Estudios recientes también demuestran que el PI(3)P participa en la citocinesis vía el reclutamiento de una proteína del centrosoma que tiene un dominio FYVE (FYVE-CENT). Este fosfoinosítido es fundamental en la formación de los puentes intracelulares que forman el cuerpo medio de la célula madre. Este cuerpo medio es constreñido por un anillo de actomiosina hasta separarse en dos células hijas (Sagona *et al.*, 2010).

Thole y Nielsen (2008) mencionan las funciones del PI(3)P en *Arabidopsis*, entre las que se encuentran su función en el tráfico de vesículas, desde el aparato de Golgi a las vacuolas, su requerimiento en la endocitosis durante el estrés salino, también parece ser esencial para que se lleve a cabo correctamente la división celular y el mantenimiento de la morfología de la vacuola. Finalmente estos autores mencionan que este fosfoinosítido parece estimular el crecimiento de las raíces.

Jung *et al.* (2002) realizaron varios estudios y observaron que el PI(3)P estimula el cierre de los estomas.

1.1.2 Fosfatidilinositol 4-monofosfato (PI(4)P)

El PI(4)P es el derivado monofosforilado más abundante del fosfatidilinositol en las células de mamíferos. Es el producto de la actividad de la fosfatidilinositol 4-cinasa (PI4K), la cual fosforila el anillo de inositol en la posición cuatro.

Este fosfolípido puede ser nuevamente fosforilado en la posición 5 por la PI5K para formar $PI(4,5)P_2$, por lo que es considerado precursor de este último. Se encuentra principalmente en el aparato de Golgi, donde su deficiencia afecta su estructura y función. Sin embargo, se ha detectado la existencia de pozas de P(I4)P que no coinciden con el aparato de Golgi (D'Angelo *et al.*, 2008).

En levaduras, mutaciones en la enzima PIK1, un tipo de PI4K, resultaron en la acumulación de estructuras intermediarias de membrana anormales llamadas cuerpos de Berkeley. Estas estructuras anormales repercuten en un transporte deficiente hacia la membrana plasmática (Odorizzi *et al.*, 2000).

D'angelo *et al.* (2008) concluyeron que la principal función del PI(4)P está en el tráfico anterógrado de membrana, en la salida de diversas moléculas del complejo de Golgi y en el metabolismo de la esfingomielina y los glucoesfingolípidos. Debido a esto, el PI(4)P es considerado un controlador maestro de los flujos de proteínas y lípidos hacia la superficie de la célula y, por lo tanto, de la composición de la propia membrana plasmática.

En las plantas el PI(4)P se encuentra en una proporción de entre 10 y 20 a 1 con respecto al $PI(4,5)P_2$ a diferencia de lo que sucede en animales donde su relación parece ser de 1 a 2; sin embargo, el desarrollo correcto de las plantas depende en gran medida de este fosfoinosítido. Las plantas de *Arabidopsis* que no expresan algunas de las enzimas involucradas en el metabolismo del PI(4)P (cinasas y fosfatasas) presentan defectos en la morfología de sus raíces y un pobre crecimiento de las mismas (Boss e Im, 2012).

1.1.3 Fosfatidilinositol 5-monofosfato (PI(5)P)

Hasta 1997 se pensó que el $PI(4,5)P_2$ se sintetizaba exclusivamente por la fosforilación de PI(4)P en la posición cinco del anillo de inositol, sin embargo, Rameh *et al.* (1997) demostraron que PI(5)P, podía también ser un precursor del $PI(4,5)P_2$. Estos autores encontraron evidencia de que éste se encontraba presente en los fibroblastos de mamíferos. Aunque se conoce la localización de las siete especies de PIPs, la de PI(5)P permanece pobremente caracterizada (Krauss y Haucke, 2007).

Se encontró que los niveles de PI(5)P en las plaquetas aumentaron transitoriamente bajo estimulación con trombina, lo que indica que este fosfoinosítido está directa o indirectamente involucrado en la activación de las plaquetas en animales (Morris *et al.*, 2000).

Meijer *et al.* (2001) reportaron a este compuesto como un nuevo fosfoinosítido monofosfato en las plantas al estudiar las pozas de PIPs, en las células vegetales. Ellos observaron que los niveles de PI(5)P solo cambiaron durante estrés hiperosmótico, sugiriendo una participación de éste en la señalización por estrés osmótico.

Ndamukong *et al.* (2010) demostraron un vínculo entre PI(5)P y la actividad de la proteína modificadora de la cromatina ATX1 que trimetila las histonas H_3, en respuesta al estrés por deshidratación. Ellos demostraron por primera vez que la deshidratación conduce a un aumento en el PI(5)P celular en *Arabidopsis*. Un homólogo de miotubularina (AtMTM1) en *Arabidopsis* es capaz de generar PI(5)P a partir de $PI(3,5)P_2$ y es esencial para el incremento en PI(5)P inducido bajo deshidratación. Este aumento retiene a la ATX1 en la membrana nuclear, evitando de esta manera que la proteína metile las histonas H_3.

1.1.4 Fosfatidilinositol 3, 5-bisfosfato ($PI(3,5)P_2$)

El $PI(3,5)P_2$ es un isómero del $PI(4,5)P_2$ que se identificó en ratones como un producto en la vía de señalización agonista-independiente sensible a wortmanina en los fibroblastos en reposo (Whiteford *et al.*, 1997). Todos los eucariotas, con la excepción de algunos protistas patógenos y microsporidios, poseen proteínas necesarias para la formación, el metabolismo y las funciones de $PI(3,5)P_2$ (Michell *et al.*, 2006).

Este fosfoinosítido es formado por la fosforilación en la posición cinco del PI(3)P. Esto sugiere que los niveles celulares relativamente constantes de PI(3)P y $PI(3,5)P_2$ se mantienen por la acción concertada de las enzimas PI(3)P 5-cinasa y $PI(3,5)P_2$ 5-fosfatasa (Whiteford *et al.*, 1997). En levaduras el $PI(3,5)P_2$ es sintetizado por la PI3K-5, FAB1p y está implicado en la regulación de la homeostasis vacuolar (Dove *et al.*, 2002).

El $PI(3,5)P_2$ es esencial en el reciclaje vesicular, el ordenamiento de las proteínas en los cuerpos multivesiculares por empaquetamiento dependiente de ubiquitina, en el crecimiento a alta temperatura y la acidificación de la vacuola. Así mismo, el $PI(3,5)P_2$ forma parte del andamiaje lipoproteico asociado con los autofagosomas y las vacuolas respectivamente (Boss e Im, 2012).

Se ha observado que mutantes carentes de las proteínas funcionales que participan en estos procesos presentan deficiencias en el transporte a través de membranas (Dove *et al.*, 2004; Michell *et al.*, 2006).

En las plantas, el $PI(3,5)P_2$ parece tener una función similar a la observada en levaduras (acidificación de la membrana, estrés osmótico, etcétera). Se ha observado igualmente que su incremento está asociado con vacuolas más pequeñas y su disminución con vacuolas más grandes (Duex *et al.*, 2006). En estudios donde se ha alterado la expresión de FAP1 en las plantas, ya sea disminuyendo o aumentado su expresión se ha observado una disminución en la endocitosis y el crecimiento de las raíces, lo que parece indicar que su estrecha regulación es esencial para el crecimiento correcto de las plantas (Thole y Nielsen, 2008).

Michell *et al.* (2006) mencionan que algunos efectores de este fosfoinosítido incluyen una familia de proteínas β-propulsoras, llamadas PROPPINs, que parecen estar involucradas en la macroautofagia, las CHMP (proteínas del cuerpo multivesicular cargado) implicadas en la autofagia y posiblemente las familias de proteínas epsina implicadas en la curvatura de la membrana que facilita procesos como la endocitosis.

La importancia de $PI(3,5)P_2$ para la función normal de las células se remarca por la evidencia de su presencia en las respuestas a la insulina en células de mamífero y por la disfunción de $PI(3,5)P_2$ en enfermedades genéticas en humanos ligadas al cromosoma X, como la miopatía miotubular, la enfermedad Charcot-Marie-Tooth de tipo 48 que está

asociada con una sinapsis más lenta de lo normal y la distrofia de la mancha corneal (Berger *et al*, 2002; Michell *et al*., 2006; Kimata *et al*., 2012).

1.1.5 Fosfatidilinositol 3, 4-bisfosfato ($PI(3,4)P_2$)

El $PI(3,4P)_2$ es otro isómeros de $PI(4,5)P_2$, Traynor-Kaplan *et al*. (1989) sugirieron que este fosfoinosítido era parte de una vía de señalización alternativa que media la respuesta mitogénica. Esta ruta también puede ser parte de la transducción de señales en los neutrófilos humanos totalmente diferenciados. Aunque se cuentan con las enzimas necesarias para su síntesis, en las plantas no se ha observado la presencia del $PI(3,4P)_2$ ((Thole y Nielsen, 2008; Boss e Im, 2012).

Se ha observado que la serina-treonina cinasa Akt, una enzima que participa en la activación de la enzima p70S6K (cinasa S6p70-ribosomal) depende en cierta medida de la cantidad de $PI(3,4)P_2$ *in vivo* y que el $PI(3,4)P_2$ sintético activa a Akt tanto *in vivo* como *in vitro*, uniéndose al fosfoinosítido vía su dominio PH, facilitando así su dimerización (Franke *et al*., 1995, 1996).

Actualmente se está estudiando la función del $PI(3,4)P_2$ en la organización y diferenciación celular, así por ejemplo Venkatesh *et al*. (2011) han estudiado la unión de la proteína secretora de la parótida (PSP) a $PI(3,4)P_2$ y señalan que esta unión puede contribuir a la organización celular durante la formación de los gránulos secretores, o a la organización por retención durante la maduración de los gránulos en glándulas salivares de ratas.

1.1.6 Fosfatidilinositol 3, 4, 5-trisfosfato ($PI(3,4,5)P_3$)

El $PI(3,4,5)P_3$ es sintetizado a partir de $PI(4,5)P_2$ y $PI(3,5)P_2$ gracias a la acción de las enzimas cinasas IP3K tipo I y de IP5K respectivamente. Mientras que PI(4)P y $PI(4,5)P_2$, son los PIPs constitutivos más abundantes, $PI(3,4,5)P_3$ es generado solo después de una estimulación a partir de los mismos fosfoinosítidos intermediarios mencionados anteriormente. En las plantas no se han podido encontrar evidencias de la presencia de este fosfoinosítido (Thole y Nielsen, 2008; Boss e Im, 2012)

Larsen *et al*. (2002) sugieren que la PI3K a través de $PI(3,4,5)P_3$, podría estar involucrada en la regulación de la morfogénesis epitelial, estimulando la formación de hendiduras en

la glándula submandibular de ratón para finalmente formar una glándula completa, poniendo de manifiesto el papel del $PI(3,4,5)P_3$ en la diferenciación de los tejidos en animales.

El $PI(3,4,5)P_3$ es también una molécula de señalización que tiene una función primordial en la quimiotaxis, que es el movimiento de las células hacia una molécula determinada denominada quimioatrayente. La quimiotaxis estimula la generación de éste fosfoinosítido y dicho proceso genera el reordenamiento de la actina del citoesqueleto hacia el borde delantero de las células migratorias. En *Dictyostelium discoideum* lo hace uniéndose directamente a los tres miembros de la proteína motora basada en actina, Miosina I (Miosina ID, IE e IF) y recluta estas proteínas hacia el borde delantero de la célula (Chen e Iijima, 2012).

1.1.7 Fosfatidilinositol 4, 5-bisfosfato ($PI(4,5)P_2$)

El $PI(4,5)P_2$ es un componente cuantitativamente menor de la membrana, aunque su concentración en regiones específicas de la membrana puede ser relativamente alta (Jespersen, 2012). Este fosfolípido es clave en la señalización, su hidrólisis por PLC, así como su fosforilación por PI(3) cinasas genera importantes segundos mensajeros. El PI(4,5)P2 por sí mismo juega un papel importante en procesos tales como la organización de la actina en el citoesqueleto, el transporte vesicular la apoptosis, la quimiotaxis y la expresión de genes (Raucher *et al.*, 2000; Payrastre *et al.*, 2001).

Xie *et al.* (2008) sugieren que los canales de potasio de rectificación entrante (Kir), requieren de la unión de $PI(4,5)P_2$ para encontrarse en forma activa. Estos canales desempeñan un papel importante en la regulación de la excitabilidad de la membrana celular al estabilizar el potencial de membrana en reposo y mediando el transporte de potasio a través de membranas.

El $PI(4,5)P_2$ que se enriquece en los speckles y en los nucléolos, podría estar involucrado en la remodelación de la cromatina y la regulación de la transcripción. Además, el $PI(4,5)P_2$ nuclear parece regular la maduración del pre-ARNm y controlar el crecimiento y la proliferación celular (Brunce *et al.*, 2006). En las levaduras y células animales se ha documentado en detalle una vía del $PI(4,5)P_2$ nuclear involucrada en la regulación de la expresión de genes que se expresan en respuestas a diferentes tipos de estrés, mientras

que en las plantas este conocimiento es incipiente (Mishkind *et al.*, 2009).

En plantas superiores su abundancia es unas diez veces menor que en animales y plantas inferiores; esto implica que durante la actividad de la PLC el metabolismo del $PI(4,5)P_2$ debe ser muy alto para producir niveles de IP_3 equivalentes a los presentes en los animales (Meijer y Munnik, 2003).

Se ha podido observar que los patrones de localización de $PI(4,5)P_2$ se ajustan rápidamente en respuesta a una variedad de estímulos. En las células guarda, la luz blanca conduce a la acumulación de $PI(4,5)P_2$ en la membrana plasmática, pero sin la intensa acumulación observada en la envoltura nuclear y otros sitios intracelulares (Lee *et al.*, 2007). El $PI(4,5)P_2$ es también redistribuido en respuesta al estrés osmótico, con una aparición en la membrana plasmática 15 min después del inicio del estrés, seguido de asociación de vesículas revestidas con clatrina (König *et al.*, 2008).

Mishkind *et al.* (2009) sugirieron que el $PI(4,5)P_2$ que se acumuló en la envoltura nuclear y el nucléolo tras el estrés por calor en células de *Arabidopsis* puede ser parte de la maquinaria que sirve para integrar las respuestas transcripcional y post-transcripcional a este tipo de estrés. Sin embargo, estos autores no pudieron demostrar ninguna asociación del $PI(4,5)P_2$ inducido por estrés con el núcleo.

Meerschaert *et al.* (2009), sugieren que la actividad de unión de los dominios PDZ a $PI(4,5)P_2$ en las proteínas ZO-2 puede ser importante para que estas proteínas se organicen en las manchas nucleares. Las manchas nucleares forman la región extranucleolar sin cromatina conocida también como agrupamiento de gránulos de cromatina. Esta estructura es parte esencial en la estabilidad y organización de dichas estructuras nucleares. Finalmente estos mismos autores especulan que la actividad de dicha proteína nuclear en la regulación de la transcripción puede ser controlada por $PI(4,5)P_2$.

1.2 Herramientas empleadas en el estudio de los fosfoinosítidos

Se han utilizado múltiples herramientas para localizar a los PIPs en los tejidos y el interior de las células. Particularmente se emplean dominios de unión a éstos fusionados a proteínas fluorescentes para poder visualizar su distribución en las células en reposo y

posteriormente observar su redistribución durante un proceso determinado, como por ejemplo un tipo de estrés.

El empleo de matrices de afinidad con PIPs fijados en las mismas, haciendo uso de etiquetas moleculares como GST o His6, ha sido una manera de estudiar las vías de señalización donde los mismos intervienen (Jungmichel *et al.*, 2014). Estas técnicas, como el ensayo de pull down, permiten sugerir la interacción entre dos moléculas mediante ensayos de competitividad, en este caso una proteína que se cree que interacciona con algún fosfoinosítido (Einarson y Orlinick, 2002).

En una versión modificada de este método se utilizan perlas de agarosa con PIPs (Echelon inc.). De esta forma se pueden identificar y aislar de un extracto de proteínas, solo aquellas que interactúan con una especie fosfoinosítida en particular.

1.3 Dominios de interacción con fosfoinosítidos

Los PIPs, como ya se ha mencionado, realizan diversas funciones de señalización. Éstas se deben en parte a la alta densidad de las cargas negativas de sus grupos fosfato. Estos grupos fosfatos son reconocidos por dominios específicos de unión a lípidos que permiten a las proteínas a las que pertenecen, interactuar con ellos (Heilmann y Heilmann, 2013).

Dantsker y Logothetis (2007), resumen las observaciones realizadas con diversos dominios de interacción con PIPs (figura 1.3) donde mencionan algunas características comunes a todos ellos. Entre ellas está la presencia de aminoácidos con cargas positivas y al menos un aminoácido aromático, que generalmente es histidina o tirosina.

Estos dominios pueden compartir entre sí un plegado similar pero el sitio de unión al fosfoinosítido puede no ser el mismo.

Sin embargo, en el caso de los dominios con poca afinidad y especificidad por fosfoinosítidos, se cree que la capacidad de éstos para unirse a un fosfoinosítido en particular, es debida a efectos estéricos.

El dominio más estudiado y más ampliamente utilizado como herramienta bioquímica es el dominio PH de la enzima PLC-δ1, de los que se hablará posteriormente.

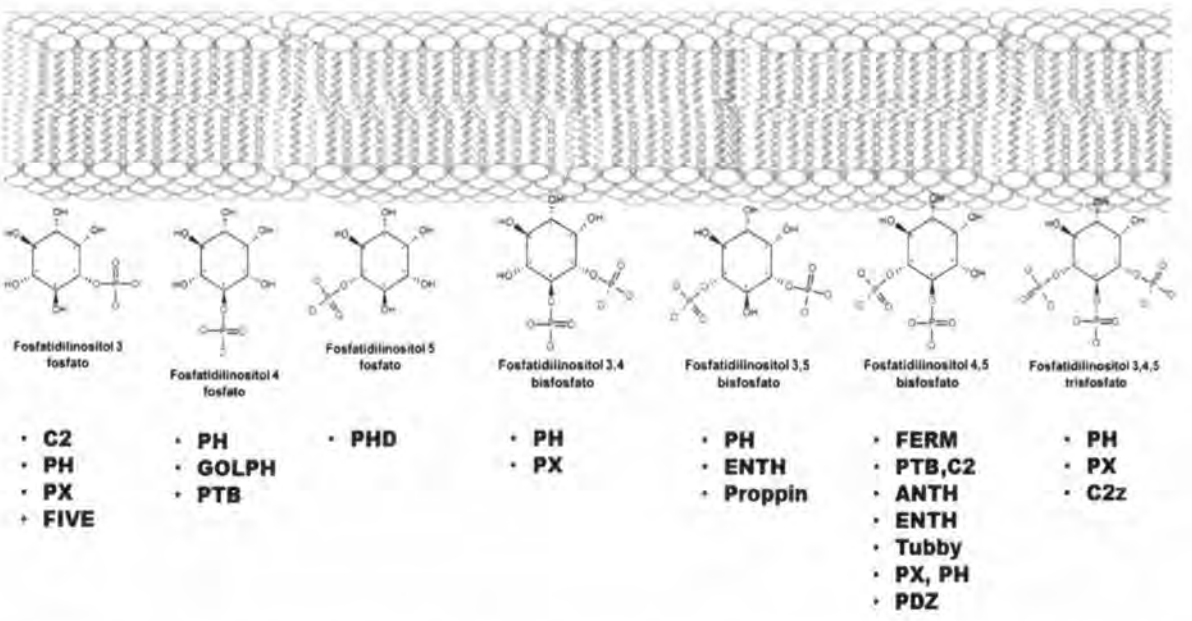


Figura 1.3. Dominios que se unen a los fosfoinosítidos. Se observan las cabezas polares de las siete especies fosfoinosítidas unidas a una membrana biológica. Debajo de ellas aparecen distintos dominios proteicos. Estos son módulos de reconocimiento que se han identificado en diversos trabajos. Están enlistados de acuerdo a los fosfoinosítidos a los que son capaces de unirse. Una mayor cantidad de dominios de unión a $PI(4,5)P_2$ han sido identificados, mientras que para PI(5)P solo se conoce un módulo de reconocimiento. Se pude apreciar además que el dominio PH es capaz de unirse a la mayoría de los fosfoinosítidos.

1.4 Fosfolipasa C

La fosfolipasa C fosfoinosítido-especifica (PI-PLC) o simplemente PLC, comprende un grupo relacionado de proteínas que se han identificado en diversos organismos procariotas y eucariotas y que escinden las cabezas de los grupos polares de los fosfolípidos derivados del inositol (Rebecchi *et al.*, 2000).

Como otras fosfolipasas, son enzimas solubles que deben unirse a las membranas biológicas con el fin de hidrolizar los fosfolípidos (Cifuentes *et al.*, 1994). Esta enzima regula el funcionamiento de proteínas en el proceso de transducción de señales. La PLC genera dos segundos mensajeros, IP_3 y DAG a partir de la hidrólisis del $PI(4,5)P_2$ (Suh *et al.*, 2008).

En las plantas no se ha podido confirmar la existencia de receptores de IP_3. Parece ser

que el hexafosfato de inositol o IP_6 más que IP_3 es el responsable de la liberación de Ca^{2+} mientras que el ácido fosfatídico (PA), el producto de la fosforilación de DAG parece funcionar como un segundo mensajero en plantas (Boss e Im, 2012). Se sabe que en *Arabidopsis thaliana* existen nueve genes que codifican para la enzima PLC (Munnik y Nielsen, 2011).

La primera evidencia de la actividad de PLC fue sugerida por Hokin *et al.* en 1953. Estos autores evaluaron la hidrólisis específica de fosfolípidos en trozos de páncreas de paloma después de la estimulación colinérgica. En 1983, Streb *et al.* demostraron que el IP_3 generado a partir de la hidrólisis de $PI(4,5)P_2$ es responsable de la movilización de calcio intracelular en las células del páncreas. En 1981, Takenawa *et al.* purificaron la primer PLC con un peso molecular de 68 kDa. Posteriormente, un número de PLCs de diferentes masas moleculares, puntos isoeléctricos y dependencia de Ca^{2+} se han identificado en varios tejidos (Suh *et al.*, 2008).

También se han identificado algunas moléculas que regulan la actividad de la PLC, entre ellas las proteínas G a través de las subunidades αq y las proteínas tirosina cinasas. Ahora se sabe que algunas de estas familias difieren en la manera en que son reguladas, tal y como se puede apreciar en la figura 1.4 (Rebecchi *et al.*, 2000).

En mamíferos se han identificado seis familias (α, β, γ, δ, ε,η y ζ) que se organizan según su tamaño y la estructura que poseen (figura 1.5) y los análisis de sus secuencias ha demostrado que la mayoría de ellas pueden ser procesadas en más de una forma, dando lugar a diversas isoformas. Su estructura en general, consta de los dominios catalíticos altamente conservados X y Y, un dominio PH (Plecktrin Homology); que es el sitio de unión al fosfoinosítido, los motivos EF hand y dominios C2 a los cuales generalmente se les une el Ca^{2+} (Suh *et al.*, 2008).

La comparación de las estructuras primarias de los miembros de cada familia muestra una significativa identidad en las secuencias de aminoácidos entre los miembros de una misma familia, pero poca entre miembros de diferentes familias (Lomasney *et al.*, 1996).

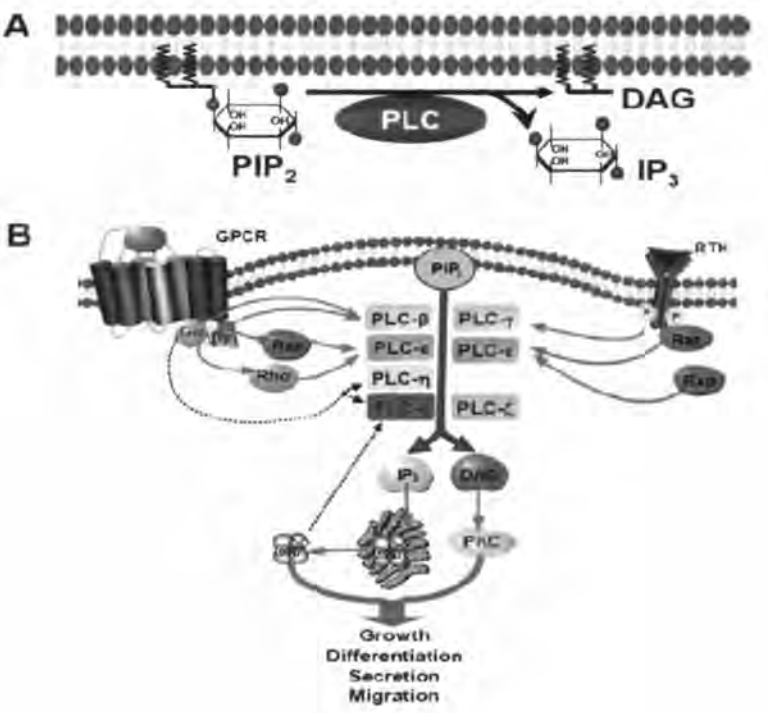


Figura 1.4. Activación y función de varias isoenzimas de PLC en mamíferos. A. Una molécula de PI(4,5)P_2 unido a una membrana hidrolizada por la enzima PLC (morado) para producir DAG e IP3. **B.** Las siete familias de PLC en mamíferos, varían en la complejidad de su regulación. Por ejemplo las familias β y ε deben ser activadas por proteínas tipo Rap y Rho que a su vez son activadas por proteínas tipo Gα., mientras que las PLC de las familias η y δ solo requieren de la proteína Gα. Finalmente todas ellas hidrolizan al PI(4,5)P_2 (tomado de Suh *et al.*, 2008).

Anteriormente se creía que las PLC de las plantas eran similares a las pertenecientes a la familia δ, pero las primeras carecían de un dominio PH, sin embargo estudios posteriores revelaron que son más similares a la familia ζ (Wang, 2004).

1.5 PLC- δ

Dentro de las distintas familias de PLCs, la isorforma PLC -δ es la más sencilla y consta de la estructura básica descrita anteriormente. Esta PLC es la más pequeña y presenta un tamaño de aproximadamente 84 kDa, tal (figura 1.5) (Suh *et al.*, 2008). Existen cuatro formas de esta PLC(PLC-δ1-δ4); cuyas secuencias de aminoácidos muy similares entre

ellas.

Al comparar las secuencias de ADN entre las familias de las PLC se sugiere que existe una relación evolutiva que indica que la PLC-δ apareció primero en los eucariotas unicelulares primitivos; de hecho las PLCs encontradas en hongos filamentosos, levaduras y plantas son similares a las PLC-δ de mamíferos (Rebecchi *et al.*, 2000).

En levaduras las isoformas δ están implicadas en la respuesta al estrés ambiental y nutricional, especialmente al relacionado con el control del crecimiento dependiente de ciclina y la exportación de los ARNm, pero se desconoce cómo se regula (Rebecchi *et al.*, 2000).

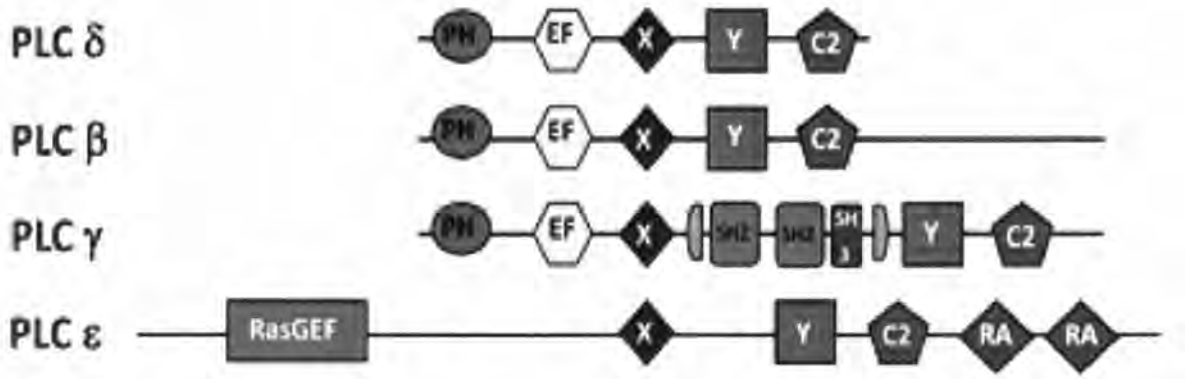


Figura 1.5. Las familias de fosfolipasas C (PLC) se clasifican según las estructuras que poseen. En esta figura se ilustran cuatro de las siete familias de fosfolipasas C en mamíferos y sus respectivas estructuras proteicas. El dominio PH está representado por un ovalo rojo. El motivo EF hand por un hexágono amarillo. El sitio catalítico X y Y están ilustrados con un rombo azul marino y un cuadro rosa respectivamente. El dominio C2 por un pentágono azul. En todas se conserva el dominio catalítico X y Y, así como el dominio C2. Los dominios SH2 y SH3, ambos de verde, están exclusivamente en las PLC de la familia γ. El dominio RasGEF (rectángulo azul) y los dos dominios RA (rombo gris) solo se encuentran en la familia de PLC ε (modificado de Suh *et al.*, 2008).

1.5.1 PLC-δ1

Esta enzima es la más abundante y la más ampliamente difundida entre los mamíferos. Ha sido encontrada en concentraciones variables en diversos tejidos y órganos, entre

ellos el músculo, el hígado y el páncreas. La concentración de esta enzima es menor que la que presentan los subtipos β y γ (Suh *et al.*, 1988). La secuenciación del gen completo en humanos muestra que esta enzima está compuesta por 15 exones que abarcan 22kb (Ishikawa *et al.*, 1997).

La PLC-δ1 se recupera principalmente en la fracción citoplasmática después de la disgregación de tejidos o cultivos celulares. Esto es debido, en gran parte, a su afinidad relativamente débil hacia la mayoría de los componentes de la membrana, a excepción del $PI(4,5)P_2$ que además se degrada rápidamente bajo diversas condiciones. Una vez que la célula se rompe y se diluye su contenido, la disociación de la enzima del $PI(4,5)P_2$ restante se completa en segundos. De esta manera la degradación de los PIPs, así como la simple dilución de los componentes de la membrana, pueden ser algunas formas de explicar la aparición de esta proteína en la fracción citoplasmática.

Sin embargo el $PI(4,5)P_2$ y los lípidos relacionados a él, son producidos en toda la célula, y también está el hecho de que la enzima puede actuar aguas abajo de la unión al receptor. Así la PLC-δ1 puede unirse a diversas membranas intracelulares y estructuras, siguiendo la distribución de este fosfoinosítido lo que podría también explicar su presencia en el citoplasma. (Rebecchi y Pentyala., 2000).

Se ha observado que una mutante nula de la PLC δ-1 provoca pérdida de pelo asociada a estructuras foliculares anormales e hiperplasia epidemial en ratones (Runkel *et al.*, 2012). Recientemente, fue identificada como una proteína anti oncogénica en humanos después de que Fu *et al.* (2007) buscaran genes localizados en la región del cromosoma 2p22, ya que éste parece estar relacionado con el carcinoma de células esofágicas escamosas o ESCC y encontraron que el gen de la PLC-δ1 es un fuerte candidato como gen supresor de tumores.

La conexión entre la PLC y la respuesta a estrés se ha demostrado en plantas superiores cuando algunos factores ambientales alteraron marcadamente la expresión de esta enzima. En *Arabidopsis*, el ARNm que codifica a la enzima AtPLC1S, se acumuló en brotes y hojas. Los niveles de ARNm de esta enzima aumentaron notablemente cuando las plantas están expuestas a la sequía, el frío, el estrés osmótico, así como al ácido abscísico, lo que indica una relación entre esta enzima y la respuesta a estos tipos de

estrés (Hirayama *et al.*, 1995).

1.5.2 Dominio PH de PLC- δ1

El dominio PH, fue descrito originalmente como un nuevo motivo proteico de aproximadamente 100 aminoácidos, repetido dos veces en la proteína pleckstrina, el principal sustrato de la proteína cinasa C (Haslam *et al.*, 1993).

Este dominio ha sido identificado en otras 100 proteínas que pueden ser agrupadas de acuerdo a su función en las siguientes clases: proteína cinasas de Ser/Thr, proteína cinasas de Tyr, reguladoras de proteínas G pequeñas, GTPasas endocíticas, enzimas que metabolizan fosfoinosítidos y proteínas asociadas al citoesqueleto (Rebecchi *et al.*, 2000). Muchas de estas proteínas participan en procesos de transducción de señales (Lemmon y Ferguson, 2000).

La estructura básica del dominio PH (figura 1.6) es la de un sándwich β de dos hojas β casi ortogonales formadas por siete cuerdas β. Las cuerdas β1 y β2 están unidas por un bucle llamado VL1, mientras que las cuerdas β3 y β4 lo están por el bucle VL2 y las β6 y β7 están unidas por el bucle VL3. Entre los bucles VL1 y VL2 se encuentra el sitio de unión al ligando. En el extremo C terminal se encuentra una alfa hélice (Lemmon y Ferguson, 2000).

Los dominios PH muestran una marcada variación en sus secuencias y diferentes afinidades y especificidades (cuadro 1.1), por lo que diferentes intentos de clasificarlos de acuerdo a su secuencia han sido poco concluyentes y los más aceptados son aquellos que se basan en su grado de especificidad (Bjørn y Begoña, 2002)

El dominio PH de la PLC-δ1 se une tanto al IP_3 como al $PI(4,5)P_2$ con una gran afinidad (Yagisawa *et al.*, 1998). Curiosamente este dominio muestra entre ocho y diez veces mayor afinidad por el IP_3 que por el $PI(4,5)P_2$.

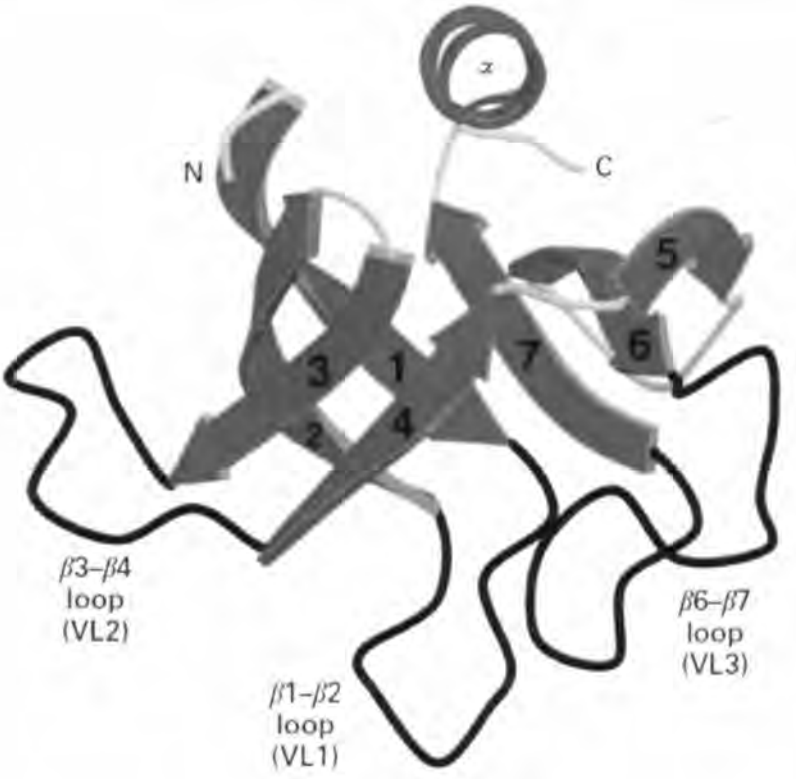


Figura 1.6. Estructura básica del dominio PH. Las flechas verdes representan las láminas beta de las dos hojas beta en el dominio PH. De negro están los bucles que unen a las cuerdas 1 y 2, 3 y 4 y 6 y 7. De azul se encuentra la alfa hélice en el extremo C terminal (Tomada de Ferguson y Lemmon, 2000).

Cifuentes *et al.* (1994) señalan que aunque la mayor parte de estos dominios se une débilmente y no específicamente a los fosfoinosítidos, el dominio PH de la PLC-δ1 reconoce estereoespecíficamente un ligando fosfoinosítido ($PI(4,5)P_2$) con alta afinidad. En el cuadro 1.1 se ejemplifican dominios PH de algunas enzimas y los fosfoinosítidos a los que estos pueden unirse.

Cuadro 1.1. Proteínas con dominios PH capaces de unirse a más de una especie fosfoinositida.

Proteína	Fosfoinositidos con los que interactúa	Método de detección	Referencia
DAPP1	$PI(3,4)P_2/PI(3,4,5)P_3$	Fat blot/PSR	Dowler, 2000
ARNO	$PI(4,5)P_2/PI(3,4,5)P_3$	Analisis de sedimentación	Macia, 2000
PKBα	$PI(3,4)P_2/PI(3,4,5)P_3$	Ensayo de liposomas	Alessi, 1997
PLC-δ1	$PI(4,5)P_2/PI(3,4)P_2/PI(3,4,5)P_3/PI(5)P$	Fat blot	Kavran, 1998; Castaño (no publicado)
ARAP1	$PI(4,5)P_2/PI(3,4)P_2/PI(3,4,5)P_3$	Ensayo arfGAP	Miura, 2002
LL5α	Todos	Fat blot/PSR	Dowler, 200o
PEPP2	$PI(3)P/PI(5)P/PI(3,5)P_2$	Fat blot	Zou, 2012

El método de detección más simple y más empleado es el Fat blot en membranas de nitrocelulosa (Echelon. Inc.). PSR: Resonancia de superficie de plasmones) GAP: Proteínas activadoras de GTPasas. ARF: Factores de ADP ribosilación).

A diferencia de otros dominios PH, el de la de PLC-δ1 tiene dos pequeñas α hélices adicionales en el extremo N terminal y en el bucle β5-β6 y ninguna de ellas tiene contacto directo con el ligando (Ferguson *et al.*, 1995). Diferentes conformaciones de la hélice α2 (de los residuos 82 al 87) pueden tener influencia en las diferentes afinidades por IP_3 o $PI(4,5)P_2$.

1.5.3 El dominio PH de la PLC-δ1 como herramienta bioquímica

Los dominios de distintas proteínas han sido utilizados como biosensores que permiten visualizar la activación de moléculas de señalización en un proceso determinado. Muchos de estos dominios están fusionados a una molécula reportera fluorescente como GFP o bien a GST que son usados en técnicas de inmunolocalización y de precipitación de proteínas (pull down). (Sabouri *et al.*, 2008).

Los dominios PH de diferentes proteínas han sido utilizados ampliamente para estudiar a distintos fosfoinositidos explotando su capacidad de unión a alguno de ellos (cuadro 1.1).

El dominio PH de la PLC-δ1 es quizás el mejor caracterizado y se ha utilizado varias veces para localizar al $PI(4,5)P_2$ en las células vivas en plantas y animales. Ha sido utilizado por ejemplo para demostrar que los dominios tipo PDZ2 de las proteínas de zonula occludens-1 y 2 en humanos (Meerschaert, *et al.*, 2009) son capaces de unirse al $PI(4,5)P_2$ nuclear.

De la misma manera, este dominio se usó para observar la dinámica en la concentración del calcio intracelular asociada al metabolismo de $PI(4,5)P_2$, Várnai y Balla (1998) hicieron un constructo PLC-δ1-PH con GFP (GFP-PH) y lo introdujeron en células de mamíferos con el fin de observar los cambios de distribución del fosfoinosítido en el interior de las células.

En 2007 van Leeuwen y colaboradores utilizaron el dominio fusionado a la proteína amarilla fluorescente (YFG) para visualizar al $PI(4,5)P_2$ en un cultivo de células en suspensión BY-2 de tabaco y en brotes de *Arabidopsis thaliana*. Los autores observaron que la mayor parte del biosensor se encontraba en el citoplasma. Los autores también mencionan que la concentración del fosfoinosítido es tan poca en la membrana que el biosensor no es capaz de detectarlo. Aunque como se mencionará más adelante, esta observación puede deberse a que el biosensor está uniéndose al IP_3.

Este mismo sistema fue empleado para observar la acumulación de $PI(4,5)P_2$ durante el estrés por calor en la membrana plasmática y en el núcleo. Durante el experimento pudo observarse la relocalización del biosensor de la membrana plasmática al citosol, y después de 45 minutos se observó un incremento de la fluorescencia en la envoltura nuclear y el nucléolo (Mishkind *et al.*, 2009).

El dominio fue utilizado por Schiekel *et al.* (2013) para recrear la vía de transducción de señales de células cardiacas de ratón y de esta manera estudiar el mecanismo de regulación de los canales iónicos tipo TASK-1. Se hizo una transfección de células CHO (Chinese Hamster Ovary) células derivadas del ovario de hamsters chinos) con el receptor TASK-1 y el receptor ET_A de la endotelina 1 (ET-1) un péptido vasoconstrictor que inhibe a los receptores TASK-1.

Estos autores buscaban probar el efecto de la ET-1 en la activación de la PLC que se creía podría jugar un papel en la inhibición de los canales tipo TASK-1. De esta manera midieron la asociación de una sonda GFP-PH a la membrana plasmática. Haciendo uso de la microscopia de fluorescencia asociaron la reorganización de la sonda GFP-PH de la membrana al citoplasma con la inhibición de los canales tipo TASK-1.

Sin embargo el dominio PH tiene una constante de disociación (Kd) de 2μM para $PI(4,5)P_2$, mientras que para IP_3 su Kd es de 0.13 μM (Lemmon *et al.*, 1995). Esto significa que quizás la señal observada pudiera ser en parte provocada por el IP_3 que desplaza al $PI(4,5)P_2$, haciendo más difícil la interpretación de los resultados (Balla *et al.*, 2000).

También, está el hecho de que en general los dominios PH no solo se unen a una especie de fosfoinosítido, sino que reconocen dos o más de ellos, por ejemplo, en el caso del dominio PH de la PLC-δ1 se ha reportado que también se une a PI(4)P, $PI(3,4)P_2$ y a $PI(3,4,5)P_3$ (Kavran *et al.*, 1998).

HIPÓTESIS

La sustitución de aminoácidos específicos dentro del dominio de homología a pleckstrina (PH) de la PLC-δ1 permitirá generar dominios con diferentes especificidades a los fosfoinosítidos.

OBJETIVO GENERAL

Modificar el dominio PH de la proteína PLC-δ1 y evaluar su especificidad por los PIPs después de dichas modificaciones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sustituir las bases nitrogenadas de la secuencia que codifica para el dominio PH usando mutagénesis directa para modificar los aminoácidos de su estructura primaria.
- Evaluar si existen cambios en la especificidad de los dominios PH mutantes con respecto al dominio silvestre mediante la técnica de Fat blot.

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que los PIPs participan en diversas funciones fisiológicas en las células eucariotas, se conoce muy poco sobre el mecanismo subyacente por el que dichas funciones se llevan cabo. Lo anterior se debe a que no se cuentan con las herramientas adecuadas para detectar a los fosfoinosítidos durante distintos procesos celulares para inferir los mecanismos por el que éstos actúan, su función específica en dichos procesos y las proteínas con las que interactúan.

Debido a esta problemática, actualmente se buscan crear dichas herramientas, mediante enzimas que posean dominios de unión a los fosfoinosítidos para que éstas sirvan como marcadores que permitan seguirlos al anclarse a ellos. La problemática de este método radica en que dichos dominios se unen a dos o más fosfoinosítidos, por lo que aquí se propone la modificación del dominio PH de la PLC-δ1 para generar dominios específicos para cada fosfoinositido.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr los objetivos señalados se propuso la siguiente estrategia experimental (figura 1.7):

Se eligieron los aminoácidos que serían mutados utilizando el software disponible para realizar alineamiento de secuencias y comparar los aminoácidos de distintas proteínas con unión a PIPs e identificar los sitios más conservados.

En este estudio se utilizó una secuencia que codifica para el dominio PH de la PLC-δ1 de Rattus novergicus reportada por Yaguisawa (1994) con la cual se cuenta el laboratorio 23 a cargo del Dr. Enrique Castaño de la Serna. Dicha secuencia se encuentra ligada al vector pGST3 (Yagisawa, 1994), que nos permitió que el dominio pudiera ser expresado fusionado a una etiqueta de Glutatión-S-Transferasa (GST) lo cual posibilita su purificación.

Además del dominio silvestre, se tiene una mutante del mismo en el que ha sido sustituida la Arginina en la posición 40 por una Alanina (R40A), cuya característica es que no se une a ningún fosfoinosítido. Esta mutante está clonada en el vector pGST3.

Se usó la técnica de mutagénesis dirigida por PCR para introducir los cambios deseados en la secuencia silvestre; se ligó al vector Pgex-2T y se transformó en la bacteria *E. coli*. Las secuencias obtenidas permitieron corroborar los cambios que se introdujeron.

Los dominios se recuperaron y purificaron, usando procedimientos como la separación por cromatografía de afinidad que nos permitieron la purificación sin comprometer la integridad del polipéptido.

Una vez purificados, éstos fueron analizados en función de su especificidad a los diferentes PIPs usando el método Fat blot. La estrategia experimental se resume en la fiura 1.7.

Figura 1.7. Diagrama experimental. La primera parte de la estrategia fue elegir los aminoácidos que serán sustituidos basándose en su importancia para la unión al $PI(4,5)P_2$. Posteriormente las sustituciones se hicieron usando una modificación de la técnica de PCR convencional llamada mutagénesis por extensión solapada, para la cual se diseñaron los iniciadores adecuados para realizarla. Una vez hechas las sustituciones a la secuencia silvestre del dominio PH, sería necesario clonarlas en un vector de expresión para poder producir y purificar los dominios mutantes y realizar análisis de afinidad y especificidad. En el caso de la mutagénesis de plásmido completo, la secuencia podía ser directamente expresada para la purificación y el análisis del dominio.

BIBLIOGRAFÍA

Berger P., Bonneick S., Willi S., Wymann M., Suter U. 2002. Loss of phosphatase activity in myotubularin related protein 2 is associated with Charcot–Marie–Tooth disease type 4B1. Human Molecular Genetics 11(13): 1569-1579.

Bjørn K. D., Begoña H. 2002. Nuclear phosphoinositides could bring FYVE alive. Trends in Plant Science 7(3): 132-138.

Boss W. F., Im Y. J. 2012. Phosphoinositide Signaling. The annual review of Plant Biology 63:409–29.

Brunce M.W., Bergendahl, K., Anderson, R.A. 2006. Nuclear PI(4,5)P(2): a new place for an old signal. Biochimica et Biophysica Acta 1761:560–569.

Chen C. L., Iijima, M. 2012. Miosin I A new $PI(3,4,5)P_3$ effector in chemotaxis and phagocytosis. Communicative and Integrative Biology 5(3): 294–296.

Cifuentes M.E., Delaney, T., Rebecchi M. J. 1994.D-Myo-inositol 1,4,5- trisphosphate inhibits binding of phospholipase C-delta 1 to bilayer membranes. Journal of Biological Chemistry 269: 1945–1948.

Cockcroft S., Garner, Kathryn. 2011 Function of the phosphatidylinositol transfer protein gene family: is phosphatidylinositol transfer the mechanism of action? Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 46(2): 89-117.

D'Angelo G., Vicinanza, M., De Matteis, M. A. 2008. Lipid-transfer proteins in biosynthetic pathways. Current Opinion in Cell Biology 20: 360–370.

Dantsker A. R., Logothetis D. E. 2007. Molecular characteristics of phosphoinositide binding. European Journal of Physiology (2007) 455:45–53.

Di Paolo G., De Camilli, P. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. Nature 443: 651–657.

Dove S. K., McEwen, R. K., Mayes, A., Hughes, D. C., Beggs, J. D., Michell, R. H. 2002. Vac14 Controls PtdIns(3,5)P2 Synthesisand Fab1-Dependent Protein Trafficking to the Multivesicular Body. Current Biology 12: 885–893.

Dove S. K., Piper, R. C., McEwen R. K., Yu, J. W., King, M. C., Hughes, D. C., Thuring, J., Holmes, A. B., Cooke, F. T., Michell, R. H., Parker, P. J., Lemmon, M. A. 2004. Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors. The EMBO Journal 23: 1922–1933.

Duex J. E., Tang F., Weisman L. S. 2006. The Vac14p–Fig4p complex acts independently of Vac7p and couples PI3,5P2 synthesis and turnover. Journal of Cell Biology 172(5): 693-704.

Echard A. 2012. Phosphoinositides and cytokinesis: The "PIP" of the iceberg. Cytoskeleton.. The Journal of Cell Biology 172(5): 693–704

Einarson M.B., Orlinick, J.R. 2002. Identification of Protein-Protein Interactions with Glutathione S-Transferase Fusion Proteins. In Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 37-57.

Falasca M., Maffucci T. 2006. Emerging roles of phosphatidylinositol 3-monophosphateases a dynamic lipid second messenger. Archives of Physiology and Biochemistry 112(4/5): 274 – 284.

Ferguson K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., Sigler, P. B. 1995. Structure of a high affinity complex between inositol 1,4,5-trisphosphate and a phospholipase C pleckstrin homology domain. Cell 83: 1037-1046.

Fu L., Qin, Y. R., Xie, D., Hu, L., Kwong, D. L., Srivastava, G., Tsao, S. W., Guan, X. Y. 2007. Characterization of a novel tumor-suppressor gene PLC delta 1 at 3p22 in esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Research. 67: 10720-10726.

Franke, T. F., Yang, S., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan,

D. R., Tsichlis, P. N. 1995. Cell 81 (5): 727–736.

Fruman D. A., Bismuth, G., Fine tuning the immune response with PI3K. 2009. Immunological Reviews. 228: 253–272.

Haslam R. J., Koide, H. B., Hemmings, B. A. 1993. Pleckstrin domain homology. Nature. 363: 309-310.

Heilmann M., Heilmann, I. 2013. Arranged marriage in lipid signalling? The limited choices of PtdIns(4,5)P2 in finding the right partner. Plant Biology 15(5):789-797.

Hirayama T., Ohto, C., Mizoguchi, T., Shinozaki, K. 1995. A gene encoding a phosphatidylinositol specific phospholipase C is induced by dehydration and salt stress in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 92: 3903–3907.

Jespersen T. 2012. Chapter 3: The Cardiac Ion Channels. Cardiac Arrhythmias– New Considerations Breijo M F. R. 45-72 InTech, disponible en: http://www.intechopen.com/books/cardiac-arrhythmias-new-considerations/the-cardiac-ion-channels.

Jung J. Y., Kim Y. W., Kwak. J. M., Hwang J. U., Young J., Schroeder J. I., Hwang I., Lee. Y. 2002. Phosphatidylinositol 3- and 4-Phosphate Are Required for Normal Stomatal Movements. The plant cell 14: 2399–2412.

Jungmichel S., Sylvestersen, K. B., Choudhary C., Nguyen S., Mann M., Nielsen M. L. 2014. Specificity and Commonality of the Phosphoinositide-Binding Proteome Analyzed by Quantitative Mass Spectrometry. Cell Reports 6: 578-591.

Kavran J. M., Kleins D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoffi, S. J., Skolniki E. Y., Lemmon M. A. 1998. Specificity and Promiscuity in Phosphoinositide Binding by Pleckstrin Homology Domains. The Journal of Biological Chemistry 273 (46) : 30497–30508.

Kimata T., Tanizawa Y., Can Y., Ikeda,S., Kuhara A., Mor I. 2012. Synaptic Polarity

Depends on Phosphatidylinositol Signaling Regulated by myo-Inositol Monophosphatase in Caenorhabditis elegans. Genetics Society of America 191: 509–521.

König S., Ischebeck, T., Lerche, J., Stenzel, I., Heilmann, I. 2008. Saltstress- induced association of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. Biochemical Journal 415: 387–399.

Krauß M., Haucke V. Phosphoinositides: Regulators of membrane traffic and protein function. 2007. FEBS Letters 581: 2105–2114

Larsen M., Hoffman, M. P., Sakai, T., Neibaur, J. C., Mitchell, J. M., Yamada, K. M. 2003. Role of PI 3-kinase and $PI(3,4,5)P_3$ in submandibular gland branching morphogenesis. Developmental Biology 255(1): 178–191.

Lee Y., Kim, Y.W., Jeon, B.W., Park, K.Y., Suh, S.J., Seo, J., Kwak, J.M., Martinoia, E., Hwang, I., Lee, Y. 2007. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is important for stomatal opening. Plant Journal 52: 803–816.

Lemmon M. A., Ferguson, K. M., O'brien R., Sigler, P. B., Schlessinger, J. 1995. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. Proceedings of the National Academy of Sciences 92: 10472-10476.

Lemmon M. A., Ferguson, K. M., Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. 2000. Biochemical Journal 350(1): 1–18.

Lewis A. E., Sommer, L., Arntzen, M. Ø., Strahm, Y., Morrice, N. A., Divecha, N., D'Santos, C. S. 2011. Identification of Nuclear Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate-Interacting Proteins by Neomycin Extraction. Molecular and Cellular Proteomics 10(2): 1-15.

Lomasney J. W., Cheng, H. Fang., Wang, L. P., Kuan, Y. S., Liu, S. M., Fesik, S. W., King, Klim. 1996. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Binding to the Pleckstrin

Homology Domain of Phospholipase C-δ1 Enhances Enzyme Activity. The Journal of Biological Chemistry 271: 25316-25326.

Meerschaert K., Tun, M. P., Remue E., De Ganck, A., Boucherie, C., Vanloo, B., Degeest G., Vandekerckhove, J., Zimmermann, Pascale., Bhardwaj, N., Lu, H., Cho, W., Gettemans, J. 2009. The PDZ2 domain of zonula occludens-1 and -2 is a phosphoinositide binding domain. Cellular and Molecular Life Sciences 66:3951–3966.

Meijer H.J., Berrie, C.P., Iurisci, C., Divecha, N., Musgrave, A. and Munnik, T. 2001. Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. Biochemical Journal 360: 491–498.

Meijer H. J., Munnik T. 2003. Phospholipid-based signaling in plants. The Annual Review of Plant Biology 54:265–306.

Michell R. H., Heath, V. L., Lemmon, M. A., Dove, S. K. 2006. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. Trends in Biochemical Sciences 31 (1): 52–63.

Mishkind M., Vermeer J., E.M., Darwish, E., Munnik, T. 2009. Heat stress activates phospholipase D and triggers $PI(4,5)P_2$ accumulation at the plasma membrane and nucleus. The Plant Journal, 60. 10–21.

Munnik T., Nielsen E. 2011. Green light for polyphosphoinositide signals in plants. Current Opinion in Plant Biology 14:489–497.

Morris J. B., Hinchliffe, K. A., Ciruela, A., Letcher, A. J. and Irvine, R. F. 2000. Thrombin stimulation of platelets causes an increase in phosphatidylinositol 5-phosphate revealed by mass assay. FEBS Lett. 475, 57-60.

Nakamura Y., Fukami, K., Yu, H., Takenaka, K., Kataoka,Y., Shirakata, Y., Nishikawa, S., Hashimoto, K., Yoshida,N., Takenawa, T. 2003. Phospholipase Cdelta1 is required

for skin stem cell lineage commitment. The EMBO Journal. 22, 2981-2991.

Ndamukong I., Jones, D. R., Lapko, H., Divecha, N., Avramova, Z. 2010. Phosphatidylinositol 5-Phosphate Links Dehydration Stress to the Activity of *arabidopsis* trithorax-like Factor ATX1. PLoS ONE 5(10): e13396 1-12.

Nezis I.P., Sagona, A.P., Schink, K.O., Stenmark, H. 2010. Divide and ProsPer: the emerging role of PtdIns3P in cytokinesis. Trends in Cell Biology 20(11):642–649.

Niedermeier M., Hennessy, B. T., Knight, Z. A., Henneberg, M., Hu, J., Kurtova, A. V., Wierda, W. G., Keating, K. M., Kevan M. S., Burger J. A. 2009. Isoform-selective phosphoinositide 3-kinase inhibitors inhibit CXCR4 signaling and overcome stromal cell-mediated drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: a novel therapeutic approach. Blood 113: 5549–5557.

Odorizzi G., Babst, M., Emr, S. D. 2000. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. Trends in Biochemical Sciences 25: 229—235.

Payrastre B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M., Gratacap, M. 2001. Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. Cell Signal 13:377–387.

Petiot A., Fauré, J., Stenmark, H., Gruenberg, J. 2003. PI3P signaling regulates receptor sorting but not transport in the endosomal pathway. The Journal of Cell Biology 162 (6): 971-979.

Rameh L. E., Tolias, K. F., Duckworth, B. C. and Cantley, L. C. 1997. A new pathway for synthesis of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. Nature 390: 192-196.

Raucher D., Staujer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J.D., Sheetz, M., Meyer, T. 2000. Cell 100: 221-228.

Rebecchi M. J., Pentyala, S. N. 2000. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. Physiology Review 80: 1291–1335.

Rhee S. G. 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. Annual Reviews of Biochemistry 70: 281–312.

Runkel F., Hintze, M., Griesing, S., Michels, M., Blanck, B., Fukami, K., Guénet L., J. L., Franz. T. 2012. Alopecia in a viable phospholipase C delta 1 and phospholipase C delta 3 double mutant. PloS one, 7(6) e39203 1-16.

Sabouri G. M., Wu Y., Hahn K., Danuser G. 2008. Visualizing and quantifying adhesive signals. Current Opinion in Cell Biology 20:541–550.

Sagona A.P., Nezis, I.P., Pedersen N.M., Liestol, K., Poulton J., Rusten, T.E., Skotheim, R.I., Raiborg, C., Stenmark, H. 2010. PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVECENT to the midbody. Nature Cell Biology 12(4): 362–371.

Schiekel J., Lindner M., Hetzel, A., Wemhöner, K., Renigunta, V., Schlichthörl, G., Decher, N., Oliver D., Daut Jürgen. 2013. Cardiovascular Research 97: 97–105.

Suh P. G., Ryu, S. H., Choi, W. C., Lee, K. Y., Rhee S.G. 1988. Monoclonal antibodies to three phospholipase C isozymes from bovine brain. Journal of Biological Chemistry 263: 14497–14504.

Suh P. G., Park J.I., Manzoli L., Cocco L., Peak J. C., Katan, M., Fukami, K., Kataoka, T., Yun, S., Ryu S. H. 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. Biochemistry and Molecular Biology Reports. 41(6): 415-434.

Thole J. M., Nielsen E. Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane Trafficking. 2008. Current opinion in plant biology. 11:620–631.

Traynor-Kaplan A. E., Thompson, B. L., Harris,A. L ., Taylor, P., Omann, G. M., Sklar, L.

A. 1989. Transient increase in phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and phosphatidylinositol trisphosphate during activation of human neutrophils. The Journal of Biological Chemistry 264: 15668-15673.

Van Leeuwen W., Vermeer, E.M. J., Gadella, W.J. T., Munnik, Teun. 2007. Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole *Arabidopsis* seedlings. The Plant Journal 52: 1014–1026.

Várnai P., Balla, T. 1998. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-[^{3}H] inositol-labeled phosphoinositide pools. The Journal of Cell Biology 143 (2,): 501–510.

Venkatesh S.G., Goyal, D., Carenbauer, A. L., Darling, D. S. 2011. Parotid Secretory Protein Binds Phosphatidylinositol (3,4) Bisphosphate. Journal of Dental Research 90 (9): 1085-1090.

Wang X. 2004. Lipid Signaling. Current Opinion in Plant Biology. 7 (3): 329-336

Whiteford C. C., Brearley, C. A., Ulug, E. T. 1997. Phosphatidylinositol 3,5 bisphosphate defines a novel PI 3-kinase pathway in resting mouse fibroblasts. Biochemical Journal 323: 597–601.

Xie L. H., John, S. A., Ribalet, B., Weiss, J. N. Phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate ($PI(4,5)P_2$) regulation of strong inward rectifier Kir2.1 channels: multilevel positive cooperativity. The Journal of Physiology 586(7): 1833–1848.

Yagisawa H., Sakuma, K., Paterson, H. F., Cheung, Allen, R. V., Hirata, H., Watanabei, Y., Hirata, M., Williams, R. L., Katan, M. Replacements of Single Basic Amino Acids in the Pleckstrin Homology Domain of Phospholipase C-d1 Alter the Ligand Binding, Phospholipase Activity, and Interaction with the Plasma Membrane. 1998. The Journal of Biological Chemistry 273: 417–424.

Zhang T. T., Li, H., Cheung, S. M., Costantini, J. L., Hou, S., Al-Alwan, M., Marshall, A. J. 2009. Phosphoinositide 3-kinase-regulated adapters in lymphocyte activation. Immunological Reviews. 232: 255–272.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Elección de los aminoácidos a mutar

La elección de los aminoácidos se realizó utilizando el programa MUSCLE (del inglés multiple sequence alignment by log-expectation o alineamiento múltiple de secuencias por esperanza logaritmica) utilizando sus parámetros base que es parte de la suite Mega 5.1.

Como primer criterio de elección se utilizó el porcentaje de conservación. Los aminoácidos elegidos fueron aquellos que tuviesen un porcentaje de conservación igual o mayor al 50%.

El segundo criterio fue la información que se recabó en las distintas fuentes de información, como artículos y bases de datos bioinformáticas.

2.2 Mutagénesis directa por extensión solapada

La mutagénesis por extensión solapada es una técnica que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y que permite introducir un cambio en una secuencia particular de ADN (Ho *et al.*, 1989).

Se realizaron cuatro reacciones de PCR para la obtención de cada mutante siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001). Se diseñaron un par de iniciadores, en sentido (F) y antisentido (R) que flanquearan la secuencia silvestre y un par de iniciadores mutagénicos internos, sentido mutagénico (FM) y antisentido mutagénico (RM) con los cambios de bases necesarios en el centro de los mismos para producir cada una de las mutantes deseadas.

En una primera reacción de PCR el iniciador F se usó en combinación con el iniciador RM, mientras que en una segunda reacción se utilizaron tanto el iniciador R como el FM para producir dos productos que corresponden secuencias parciales del dominio con su respectivo cambio de bases.

En una tercera reacción se utilizaron los dos productos resultantes de las reacciones anteriores que sirvieron como iniciadores que, tras desnaturalizarse y realinearse,

solapándose a partir de los cambios de bases introducidos, dieron como resultado la secuencia completa con los cambios de bases deseados. Finalmente, la secuencia mutante fue amplificada en una cuarta reacción de PCR. En la figura 2.1 se ilustra el proceso completo.

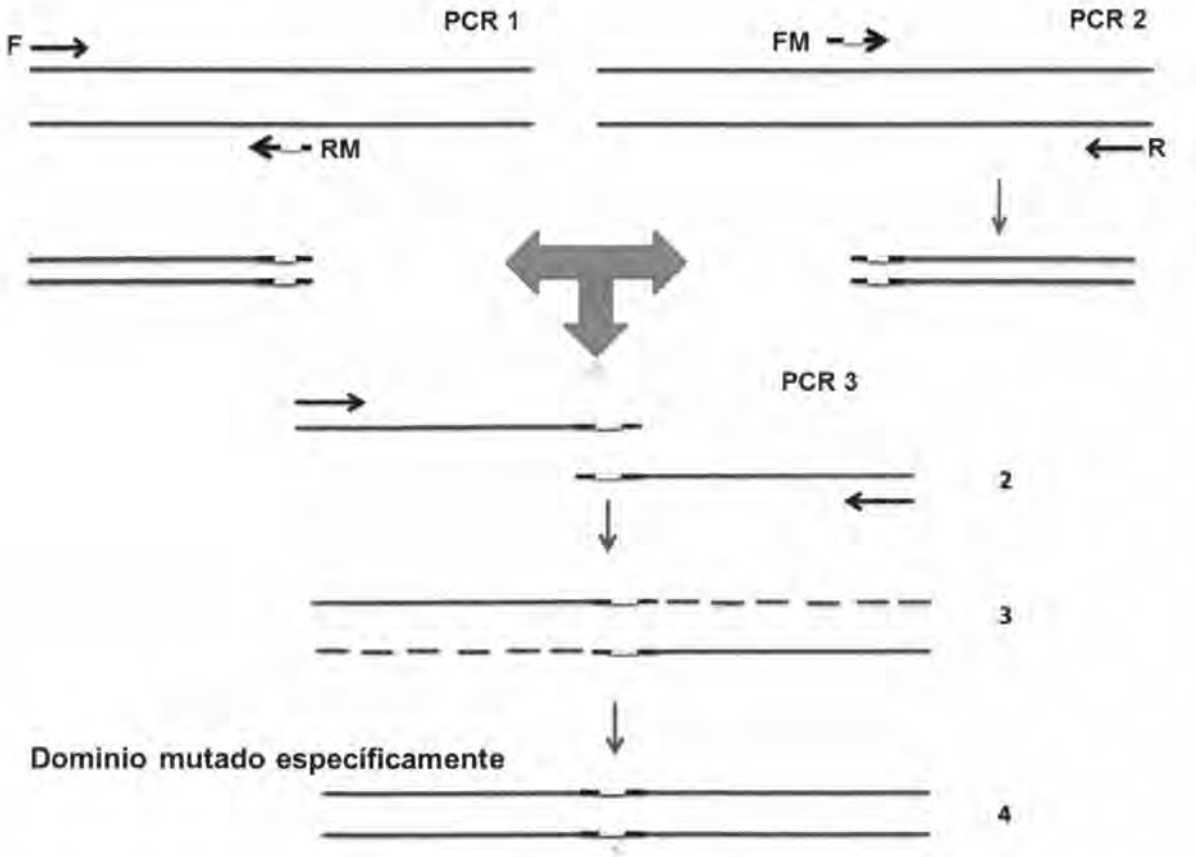


Figura 2.1. Esquema general de la mutagénesis por extensión solapada. Los iniciadores en sentido y antisentido están representados con flechas negras, mientras que los iniciadores en sentido mutante (FM) y antisentido mutante (RM) con flechas negras con el centro blanco, que representa los cambios de bases. Las flechas verdes representan las reacciones de PCR. La triple flecha azul ilustra la combinación de las dos primeras PCR para realizar una tercera donde se unirán ambos fragmentos para tener una secuencia mutante completa, representada con líneas negras con centro blanco (idénticas a los iniciadores mutagénicos).

Todas las reacciones tuvieron como componentes básicos: el amortiguador de la reacción 10x, una solución de dNTPs (las cuatro bases cada una al 20mM), ADN polimerasa taq, ADN molde y sulfato de magnesio ($MgCl_2$). Así mismo las reacciones se

llevaron a cabo en un termociclador siguiendo la programación ilustrada en el cuadro 2.1. En el caso de las reacciones de amplificación del plásmido completo se utilizó la ADN polimerasa Pfx y sulfato de magnesio ($MgSO_4$).

Cuadro 2.1. Programación del termociclador para la mutagénesis por extensión solapada.

Desnaturalización inicial	Ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Polimerización
2 min 94 °C	30	1 min 94 °C	1 min 60 °C	1-3 min. 72 °C
	Final	1 min 94 °C	10 min 72 °C	

2.3 Mutagénesis de plásmido completo

En esta técnica de PCR se utilizaron dos iniciadores complementarios entre sí, que portan los cambios de bases, éstos hibridaron con el plásmido pGST3 (Yagisawa, 1994), el cual permitió expresar los dominios fusionados a una etiqueta de GST. Los iniciadores permitieron amplificar la secuencia completa del plásmido con los cambios (Laible y Boonrod, 2009).

Después de la reacción de PCR (cuadro 2.2) se obtuvieron plásmidos con una cadena mutagénica y una silvestre. Las cadenas silvestres se degradaron utilizando la enzima Dpn I, la cual realiza un corte en el ADN metilado. Ya que las cadenas sintetizadas durante la PCR no son metiladas posteriormente, éstas permanecieron intactas y se rehibridaron con su cadena complementaria mutante.

Se obtuvieron plásmidos con círculos mellados, con las mellas en la cadena opuesta desplazados aproximadamente 42 bases de distancia (figura 2.2). Una vez que las bacterias fueron transformadas con el plásmido, éstas se encargaron de reparar dichas mellas.

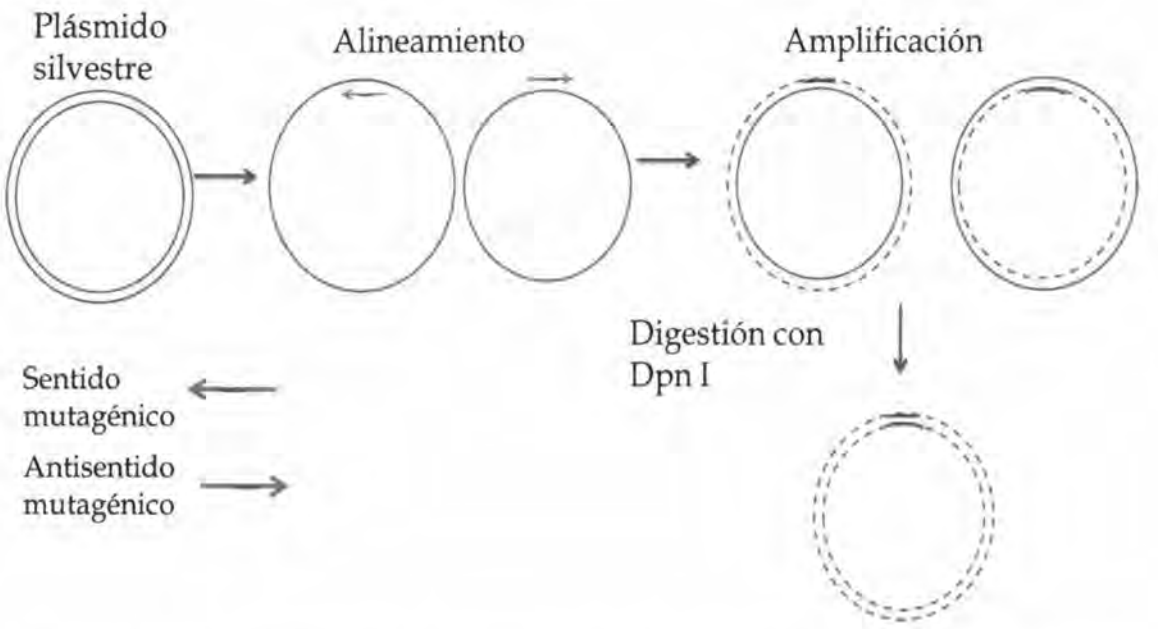


Figura 2.2. Esquema general de la mutagénesis del plásmido completo. El plásmido silvestre es amplificado completamente utilizando dos iniciadores complementarios con los cambios de bases deseados. Se sintetizaron nuevas cadenas mutantes que se hibridaron con la cadena silvestre molde. Las cadenas silvestres fueron digeridas con la enzima Dpn I lo que permitió obtener un plásmido mutante con sus dos cadenas complementarias.

Cuadro 2.2. Programación del termociclador para la mutagénesis de plásmido completo.

Desnaturalización inicial	No. de ciclos	Desnaturalización	Hibridación	Polimerización
2 min 94 °C	12 ciclos	1 min 94 °C	1 min 60 °C	13 min. 72 °C

2.4 Diseño de iniciadores

Para la mutagénesis por extensión solapada se requirió que los iniciadores mutagénicos fuesen de aproximadamente 23 bases de nucleótidos y que las bases mutagénicas se encontraran en medio del iniciador, mientras que las bases que flaquean a estas debían ser complementarias a la secuencia original Laible y Boonrod, 2009).

Para fines del trabajo se diseñaron iniciadores de 23 pares de bases con dos o más

cambios de bases y un par de iniciadores que flanqueaban la secuencia que codifica al dominio silvestre y que correspondían a la secuencia del plásmido.

En el caso de la mutagénesis del plásmido completo se utilizaron únicamente los iniciadores internos.

2.5 Ligación de los productos de PCR en el vector pGEM-T Easy

Las secuencias amplificadas de las mutantes obtenidas a partir de la PCR por extensión solapada se ligaron en el vector pGEM-T Easy (50ng) con 1 μl de la enzima T4 ligasa (3U/ μl), 1 μl de la reacción de PCR y 5 μl del amortiguador de la reacción (2X) en una reacción de ligación con un volumen final de 10 μl incubada a 4 °C toda la noche para posteriormente usar dicho producto para transformar posteriormente a *E. coli* DH5α o TOP 10 químiocompetentes.

2.6 Transformación de bacterias e inducción de la expresión de los dominios

Para propagar el vector con las secuencias silvestres y mutantes se prepararon bacterias *E. coli* DH5a y TOP1O competentes por el método químico con cloruro de calcio ($CaCl_2$) al 0.1M (cohen *et al.*, 1972); estas células crecieron en medio LB a 37°C y 200 revoluciones por minuto (rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4-0.6. Para la inducción se usaron bacterias *E. coli* BL21 competentes que crecieron en las mismas condiciones que las anteriores. La transformación de ambas cepas se llevó a cabo por el método de choque térmico. Para la expresión de los dominios se usó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido o IPTG al 0.1M en medio LB durante dos horas, a 37°C y 200rpm.

2.7 Purificación de los dominios

Una vez expresados los dominios fusionados GST, se utilizó una cromatografía de afinidad para la purificación de los mismos. Se utilizó una columna con 75 μl de la resina glutatión-sefarosa 4B. Posteriormente, los dominios se recuperaron de dicha matriz bajo condiciones de elución suaves con 75 μl de glutatión10 mM para conservar la antigenicidad y la funcionalidad de los dominios.

2.8 Inmunodetección de los dominios silvestre y mutantes

Para realizar el análisis de la afinidad y especificad de los dominios mutantes, fue necesario contar con anticuerpos capaces de reconocerlos. Los anticuerpos se obtuvieron de suero de conejos inmunizados dos veces con 20 μl del dominio PH silvestre (0.11 μg/μl) un mes y dos semanas previas al primer sangrado. Posteriormente fueron reinmunizados una semana previa a los siguientes dos sangrados.

Se hicieron un total de 3 sangrados de donde se obtuvieron 40 ml de sangre. La sangre fue centrifugada a 4500rpm y se recuperaron 20 ml de suero que se distribuyó y almacenó en alícuotas de 1.5 ml y se almacenaron a 4, -20 y -80 °C.

Para verificar la presencia de anticuerpos contra los dominios se realizó la técnica de western blot. Primero se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa pura.

Una vez transferidas a la membrana, ésta se incubó en el amortiguador PBS-T (amortiguador salino de fosfatos más tween al 0.1%) con 3% de agente bloqueador durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se lavó tres veces con PBS-T durante 15 minutos cada lavado y se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS-T y se incubó con el anticuerpo primario procedente del primer sangrado durante 40 minutos a temperatura ambiente y se lavó tres veces más con el PBS-T.

El anticuerpo secundario está conjugado con la enzima peroxidasa que emite una señal quimioluminiscente al catalizar la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrÓgeno (H_2O_2).

Finalmente, la membrana se reveló usando una película fotográfica en la que se apreciaron las señales (manchas oscuras) que deben corresponder al sitio de localización en el gel de los dominios PH.

2.9 Ensayo de interacción de los dominios silvestre y mutantes con fosfolípidos

Con los anticuerpos que reconocen a los dominios PH, tanto silvestre como los mutados y una vez que los dominios fueron expresados y purificados, se realizaron Fat blots con cada uno de ellos.

Para la realización de esta metodología se usaron membranas de nitrocelulosa que contienen 100 picomoles de distintos fosfolípidos, incluyendo las siete especies fosfoinosítidas (echelon).

Cada membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente con 5 ml de PBS-T más 3% de BSA, posteriormente se lavaron tres veces con 5ml de PBS-T durante 15 minutos por lavado para después dejarlas incubando toda la noche a 4 °C en 3 ml de PBS-T más 3% de BSA y una concentración de 0.5μg/mL de cada dominio.

Transcurrido el tiempo de incubación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario a una concentración de 1/4000 durante dos horas a temperatura ambiente. La membrana se lavó nuevamente y se incubó con el anticuerpo secundario a una concentración de 1/5000 durante una hora a temperatura ambiente, enseguida se lavó con PBS-T y finalmente se expuso a los sustratos de la peroxidasa para enseguida ponerla en contacto con una película fotográfica para observar la interacción y con cuales fosfolípidos estaba ocurriendo.

BIBLIOGRAFÍA

Birnboim H. C. Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research 7: 1513-1523.

Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu I. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 69: 2110-2114.

Ho S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., PuUen, J.K., Pease, L.R. 1989. Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. Gene 77: 51-59.

Laible M., Boonrod K. 2009. Homemade Site Directed Mutagenesis of Whole Plasmids. Journal of Visualized Experiments 27: 1135.1137.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Selección de los aminoácidos a mutar.

Se realizó una búsqueda o BLAST en la base de datos del NCBI utilizando la secuencia de aminoácidos del dominio PH de la PLC-δ1 perteneciente a *Rattus novergicus* utilizando la secuencia de nucleótidos del dominio con una longitud de 426 bases de nucleótidos.

Esta búsqueda arrojó un total de 100 secuencias similares a la PLC-δ1. Todas las secuencias pertenecieron a fosfolipasas de diversos organismos, de entre ellas se seleccionaron nueve, siguiendo el criterio de tomar aquellas con un menor porcentaje de similitud pero que además tenían afinidad por los fosfoinosítidos. Las secuencias se enlistan en el cuadro 3.1.

Además de lo anterior también se obtuvo información recopilada en el NCBI referente a los aminoácidos que participan directamente en la unión del dominio PH silvestre de –δ1 a fosfoinosítidos (PMID 8521504). Estos aminoácidos son las Lisinas en las posiciones 30, 32 y 57, el Triptófano en la posición 36, las Argininas en la posiciones 40 y 56 y la Serina en la posición 55. El alineamiento y sus resultados se muestran en la figura 3.1.

Cuadro 3.1. Secuencias utilizadas para el alineamiento de secuencias hecho con el programa Mega 5.1

No. de secuencia	No. De Acceso	Organismo	Nombre
1	gi|1943485	*Rattus norvegicus*	PLC-delta1
2	gi|14249340	*Homo sapiens*	PLC delta 4
3	gi|19115964	*Homo sapiens*	PLC delta 3
4	gi|1079040)	*Drosophila melanogaster*	PLC gamma-D
5	ref/XP 859460.1	*Canis lupus familiaris*	PLC delta-1

Cuadro 3.1. Continuación.

No. de secuencia	No. De Acceso	Organismo	Nombre
6	gi|417490	*Saccharomyces cerevisiae*	PLC-1
7	ref/AAA93481.2	*Cricetulus griseus*	PLC-delta1
8	gb|ACA05825.1	*Paralichthys olivaceos*	PLC delta 1A
9	gi|730329	*Schizosaccharomyces pombe*	PLC-1
10	gi|54539	*Homo sapiens*	PLC epsilon

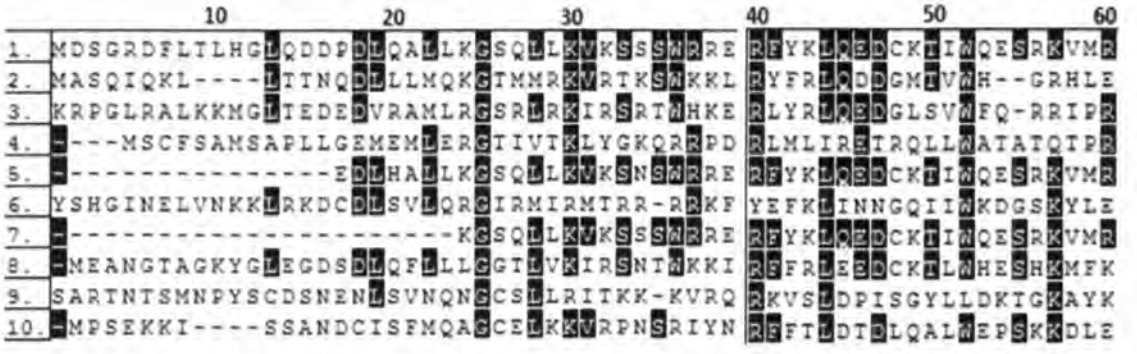


Figura 3.1. Alineamiento de secuencias de distintos dominios PH hecho con el método MUSCLE. Los sitios conservados en un 50% o más están sombreados con negro. Las secuencias corresponden a cada una de las que aparecen en el cuadro 3.1. El orden en el que se encuentran es el mismo que en dicho cuadro.

En el alineamiento se aprecia que dos Glicinas están conservadas en todas las secuencias. Se puede observar una coincidencia entre algunos de los aminoácidos conservados en el alineamiento y aquellos que participan en el reconocimiento de los fosfoinosítidos. Estos mismos aminoácidos se encuentran conservados en un porcentaje mayor al 50% con excepción del Triptófano 36 y Serina 55.

Se puede ver que hay un número mayor de aminoácidos que están conservados en más del 60% y en general son aminoácidos con cargas positivas, la Histidina 57 y la Arginina 76 (con un porcentaje de conservación del 90%) y aminoácidos alifáticos como la Isoleucina 99 y la 72 con el 90% y el 70% de conservación respectivamente. La Fenilalanina 97 y la Alanina 112 con un porcentaje de conservación del 70%. Los Triptófanos 52 y 121 están conservados en un 80% de las secuencias.

Los aminoácidos más interesantes son los que tienen carga positiva ya que los fosfoinosítidos poseen cargas negativas debido a los grupos fosfato y en un trabajo de Dantsker y Logothetis (2007) mencionan que la presencia de aminoácidos con estas características es común en dominios que se unen a los PIPs.

Los aminoácidos elegidos para ser sustituidos fueron: la Lisina 30, el Triptófano 36, la Arginina 40 y la Serina 55 (figura 3.2).

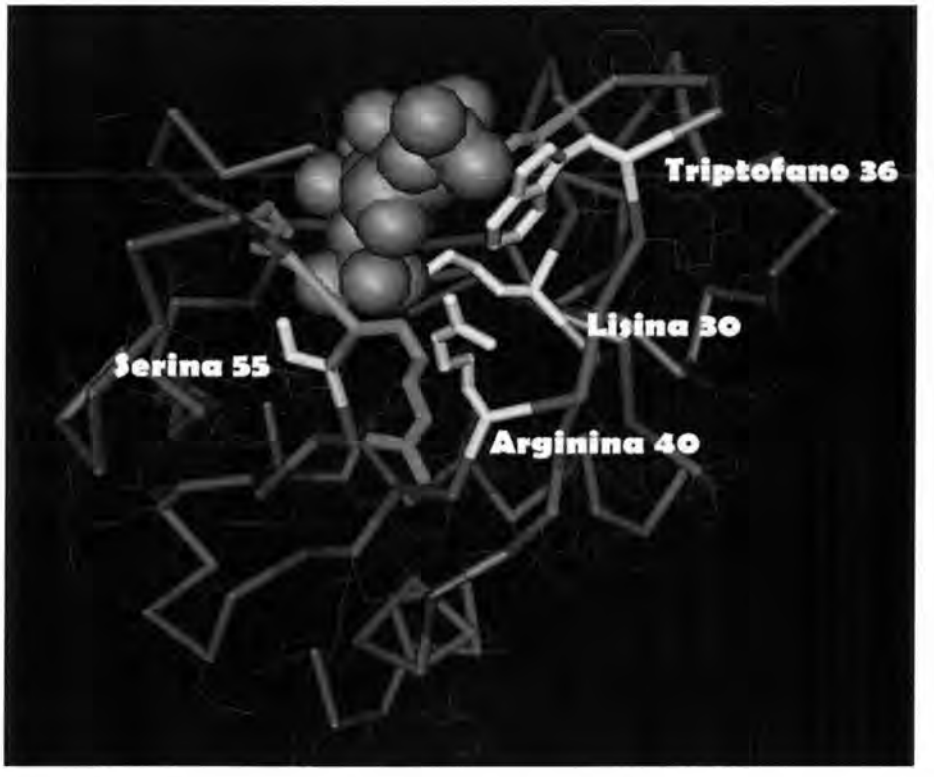


Figura 3.2. Modelo tridimensional del dominio PH de la PLC-δ1 unido al IP_3. Figura generada en el programa CN3D a partir de los datos de Ferguson *et al.*, 1995). En verde están resaltados los aminoácidos esenciales en el reconocimiento del $PI(4,5)P_2$ por parte del dominio PH. De amarillo

los aminoácidos que fueron seleccionados para ser sustituidos en el presente trabajo. De gris a rojo el porcentaje de conservación de cada residuo aminoacídico, siendo los de gris los aminoácidos menos conservados y los rojos aquellos que están conservados en el 100% de las secuencias que se usaron para compararse en un alineamiento de secuencias (cuadro 3.1). De naranja la molécula del IP_3 usada para determinar la interacción de los grupos fosfato 4 y 5.

Los cuatro aminoácidos están reportados en el NCBI como aquellos que están en contacto directo con los fosfoinosítidos. Tal característica fue apoyada por el resultado del alineamiento con las secuencias seleccionadas en este estudio y uno realizado por el trabajo citado previamente, que sugieren la importancia de estos en la funcionalidad del dominio PH

La Lisina 30 sería sustituida por Arginina y Alanina. El Triptófano 36 sería reemplazado por Fenilalanina y Tirosina. La Arginina 40 sería reemplazada por Lisina e Histidina. Finalmente la Serina 55 sería sustituida por Alanina y Glutamato tal y como se ilustra en el cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Aminoácidos seleccionados para reemplazo por medio de mutagénesis dirigida por PCR y aminoácidos por los que serán sustituidos. La Lisina 30 sería sustituida por Arginina y Alanina. El Triptófano 36 sería reemplazado por Fenilalanina y Tirosina. La Arginina 40 sería reemplazada por Lisina e Histidina. La Serina 55 sería sustituida por Alanina y Glutamato

AMINOÁCIDO WT	POSICIÓN	AMINOÁCIDO MUT1	AMINOÁCIDO MUT2
Lisina	**30**	**Arginina**	**Alanina**
Triptófano	**36**	**Fenilalanina**	**Tirosina**
Arginina	**40**	**Lisina**	**Histidina**
Serina	**55**	**Alanina**	**glutamato**

3.2 Diseño de iniciadores

Para introducir las mutaciones en la secuencia silvestre del dominio PH se diseñaron 16 iniciadores, ocho en dirección sentido y ocho en dirección antisentido y las secuencias de estos oligonucleótidos se encuentran en el cuadro 3.3.

Cuadro 3.3. Iniciadores diseñados para realizar las mutaciones. Todos los iniciadores tienen un total de 23 pares de bases. Los iniciadores diseñados para mutar la secuencia silvestre del dominio PH tienen los cambios de bases necesarios flanqueados por 10 bases a cada lado, ambos flancos son complementarios a la secuencia silvestre. Los iniciadores fueron analizados con el programa oligo analyzer. La Tm en la columna cinco, ha sido obtenida con el programa. En la última columna se encuentra la mutación que introduce en la secuencia silvestre.

No.	Nombre	Bases	Secuencia	Tm °C	Mutación
1	FPH	23	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	65.7	-
2	RPH	23	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	65.2	-
3	FM(1)	23	CCAGCTTCTGCGTGTGAAGTCCA	61.6	K30R
4	RM(1)	23	TGGACTTCACACGCAGAAGCTGG	61.6	K30R
5	FM(2)	23	CCAGCTTCTGGCCGTGAAGTCCA	63.6	K30A
6	RM(2)	23	TGGACTTCACGGCCAGAAGCTGG	63.6	K30A
7	FM(3)	23	GTCCAGCTCGTTTCGTAGGGAAC	59.6	W36F
8	RM(3)	23	GTTCCCTACGAAACGAGCTGGAC	59.6	W36F
9	FM(4)	23	GTCCAGCTCGTACCGTAGGGAAC	60.9	W36Y
10	RM(4)	23	GTTCCCTACGGTACGAGCTGGAC	60.9	W36Y
11	FM(5)	23	GCGTAGGGAAAAATTCTACAAGC	54.3	R40K
12	RM(5)	23	GCTTGTAGAATTTTTCCCTACGC	54.3	R40K
13	FM(6)	23	GCGTAGGGAACATTTCTACAAGC	56.0	R40H
14	RM(6)	23	GCTTGTAGAAATGTTCCCTACGC	56.0	R40H
15	FM(7)	23	CTGGCAGGAAGCCCGAAAGGTCA	63.7	S55A
16	RM(7)	23	TGACCTTTCGGGCTTCCTGCCAG	63.7	S55A
17	FM(8)	23	CTGGCAGGAAGAACGAAAGGTCA	59.3	S55E
18	RM(8)	23	TGACCTTTCGTTCTTCCTGCCAG	59.3	S55E

3.3 Recuperación de los plásmidos con las secuencias de los dominios PH de la PLC-δ1 silvestre y mutante R40A.

Antes de comenzar con la mutagénesis por extensión solapada (anexo) y la de plásmido completo, fue necesario obtener una mayor cantidad del plásmido pGST3 que Se

transformaron bacterias *E coli* TOP10, haciendo dos repeticiones para cada dominio y después se realizaron minipreps a cada una siguiendo los protocolos descritos anteriormente. Para finalizar se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para comprobar la presencia del plásmido cuyo tamaño esperado era de ~5548 pb. Debido a que el plásmido se encontraba presente en más de una conformación la banda mayoritaria migró con un patrón de ~3054 pb que corresponde a su forma super enrrollada. Los resultados de la electroforesis se muestran en la figura 3.3.

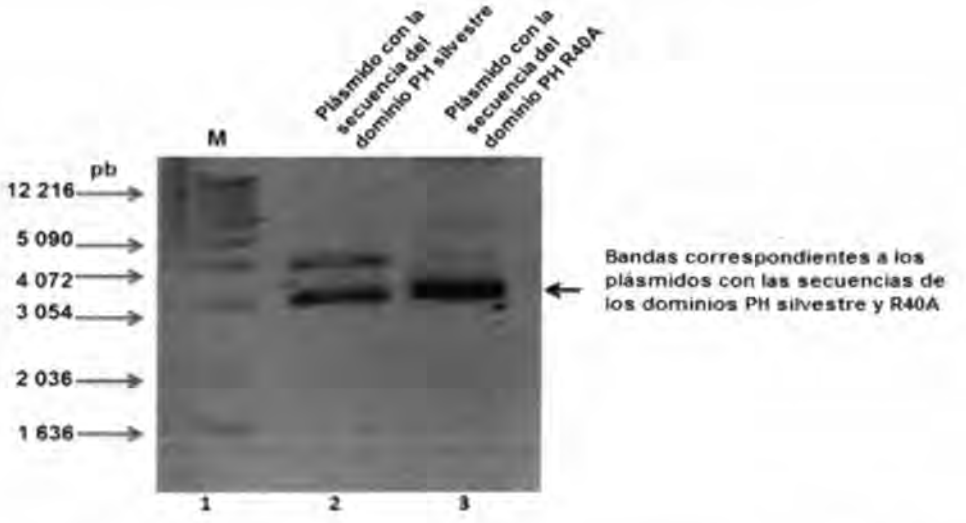


Figura 3.3. Recuperación de los plásmidos con los dominios PH silvestre y mutante R40A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de las minipreps hechas de las muestras de BL21. M (Carril 1): Marcador de 1kb. Carril 2: miniprep del plásmido con la secuencia del dominio PH silvestre. Carril 3: plásmido con la secuencia del dominio mutante R40A.

3.4 Purificación de los dominios PH de la PLC-δ1 silvestre y mutante (Mut) (W40A)

Las cepas BL21 se sometieron a inducción para que cada una expresara el dominio con el que habían sido transfectadas. Las proteínas se recuperaron después de una lisis y se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% para confirmar la presencia del dominio, que tiene una masa molecular de ~16.67 kDa más la masa molecular de la GST de ~ 30 kDa lo que da un total esperado de ~43.67 kDa., como se muestra en la figura 3.3

Con el objetivo de confirmar la purificación de los dominios, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 10%. En los carriles del gel (figura 3.4) que corresponden a las eluciones realizadas con glutatión 10mM se aprecia una sola banda que corresponde a la del tamaño esperado para los dominios silvestre y R40A. Lo que indica que la purificación fue muy eficiente.

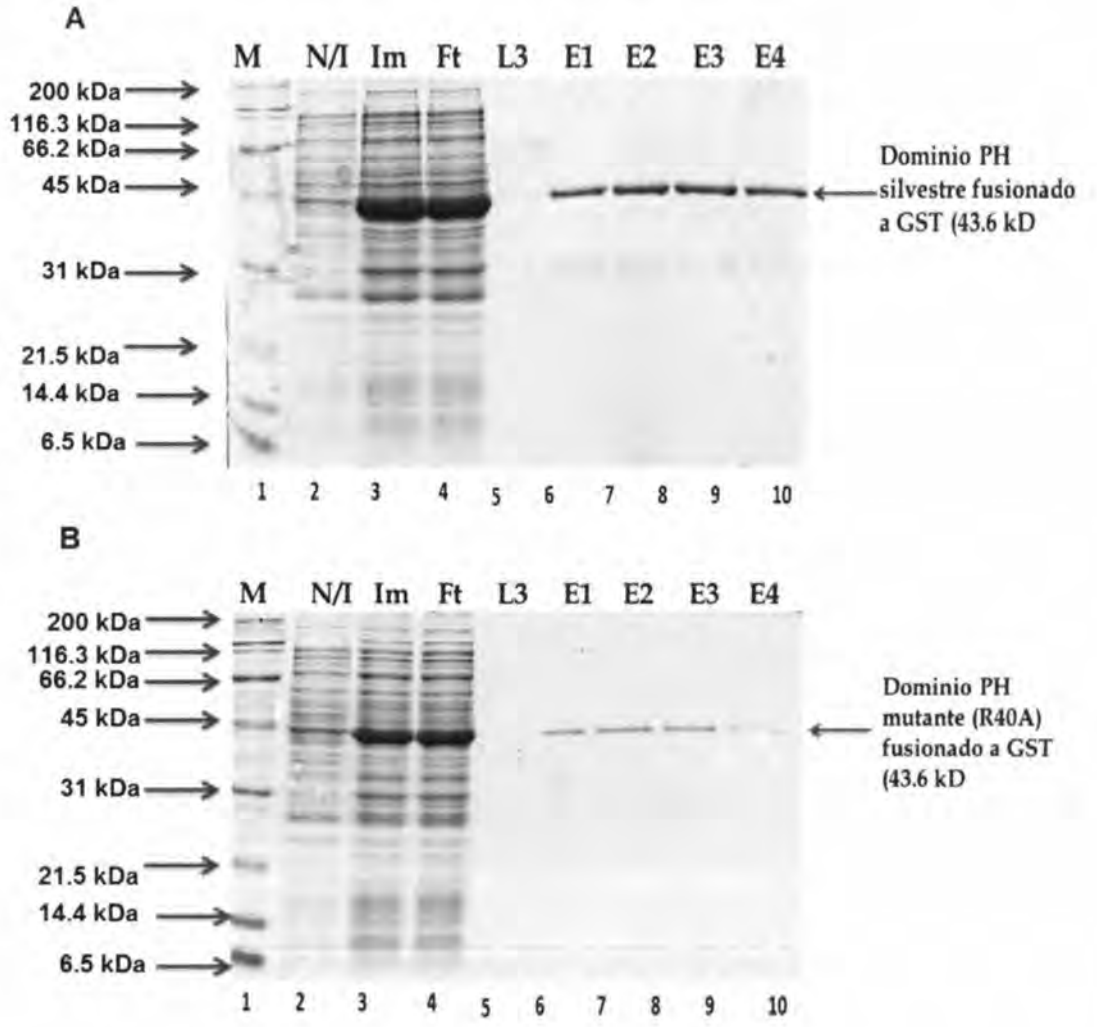


Figura 3.4. Purificación de los dominios PH silvestre y mutante R40A. A)) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación del dominio PH silvestre. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. Im (carril 3): extracto total de los dominios inducidos. Ft (carril 4): filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9):

eluciones con glutatión al 10mM. **B)** Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación del dominio PH R40A.

3.5 Mutagénesis del plásmido completo del dominio PH de la PLC-δ1

Se evaluó el efecto de la concentración de $MgSO_4$ para determinar la concentración que permitiera realizar de forma óptima la reacción de PCR (figura 3.5). Con este experimento se observó que la concentración óptima fue de 2mM.

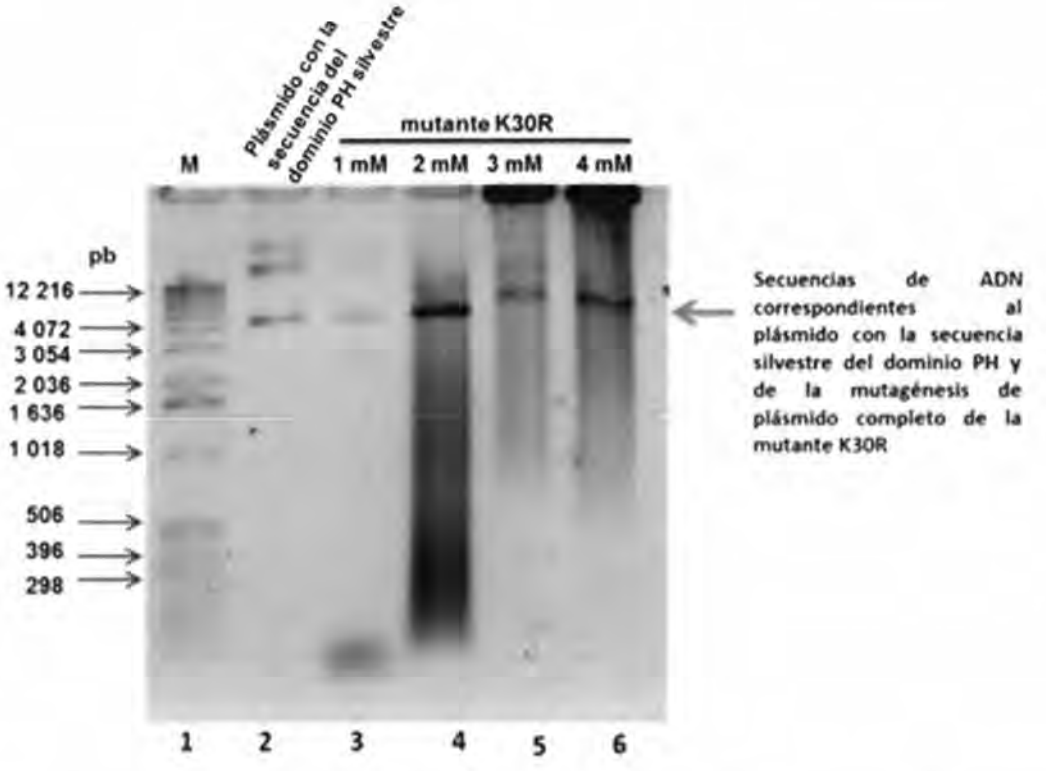


Figura 3.5. Optimización del $MgSO_4$ para la mutagénesis del plásmido completo. Electroforesis en gel I de agarosa al 1% con los productos de PCR con diferentes concentraciones de $MgSO_4$. Carril 1: Marcador molecular de 1kb. Carril: productos de PCR amplificado con 1mM de $MgSO_4$. Carril 2: Plásmido con las secuencias del dominio PH silvestre. Carril 3: productos de PCR amplificado con 2mM de $MgSO_4$. Carril 4: productos de PCR amplificado con 3mM de $MgSO_4$. Carril 6: productos de PCR amplificado con 4mM de $MgSO_4$.

Para mutar la secuencia silvestre del dominio PH se utilizaron los iniciadores FM2 y RM2 para la mutante K30A. Se utilizó el programa descrito previamente en la sección de materiales y métodos.

Se verificó que los iniciadores habían amplificado el dominio PH mediante un gel de agarosa al 1%. Se observó que la presencia de un producto con el del tamaño esperado para dicha mutante (figura 3.6).

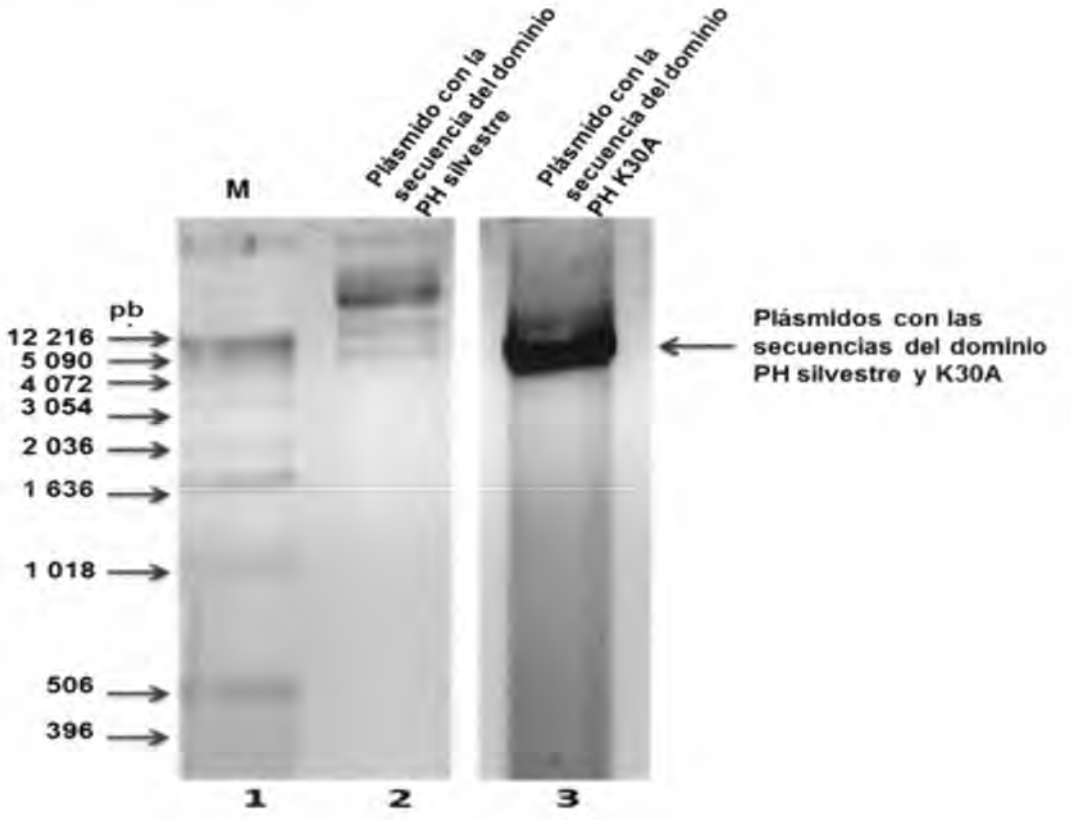


Figura 3.6. Comprobación de la amplificación de plásmido completo para obtener la mutante K30A. Electroforesis en gel I de agarosa al 1% para verificar si en la PCR se amplificaron las secuencias de ADN deseadas. Carril 1: Marcador molecular de 1kb. Carril 2: banda correspondiente del dominio PH silvestre. Carril 3: banda correspondiente al plásmido con la secuencia del dominio PH K30A.

El producto resultante de la PCR fue digerido con la enzima Dpn I durante una hora y posteriormente fue usado para transformar *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Las

bacterias se plaquearon en cajas Petri con medio LB agar con penicilina (100mg/ml) y crecieron toda la noche.

Se tomaron colonias individuales de las cajas Petri y se inocularon en tubos con medio LB líquido con ampicilina para que crecieran durante toda la noche. Posteriormente, las colonias se lisaron mediante minipreps y se recuperaron los plásmidos que contenían las posibles secuencias mutantes. El resultado de dichas minipreps se muestra en la figura 3.7.

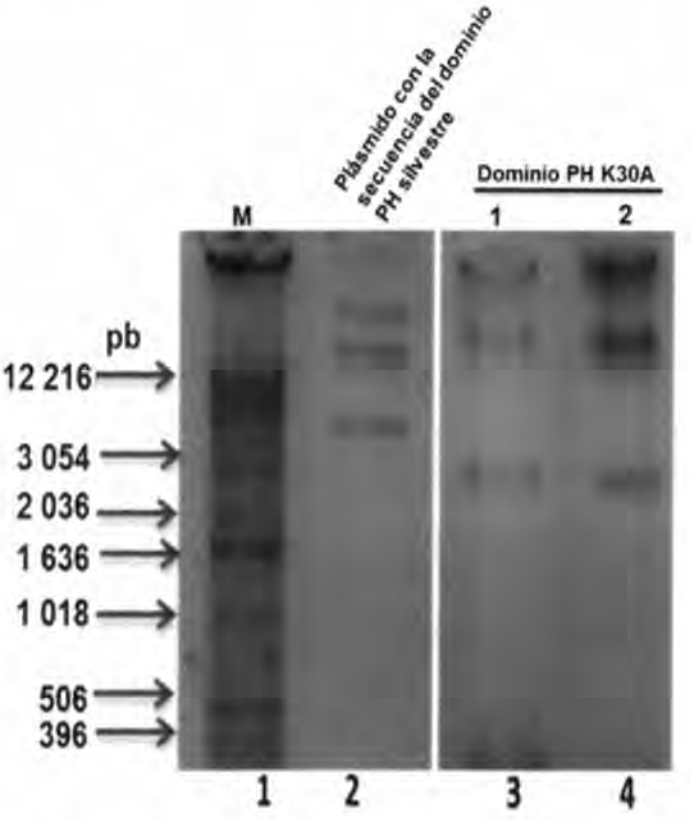


Figura 3.7. Recuperación del plásmido con la secuencia del dominio PH mutante K30A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos recuperados mediante minipreps. Carril 1: Marcador de 1kb. Carril 2: plásmido con el dominio PH silvestre. Carriles 3 y 4: Plásmidos correspondientes a la posible mutante (K30A).

Con el propósito de verificar que las bandas observadas en la figura 3.7 correspondían a la de los plásmidos mutantes, los mismos se digirieron con la enzima Sal I para linealizar

dichos plásmidos y se esperaba una banda con un patrón de migración correspondiente a una secuencia de ~5 400 pb (figura 3.8). Se observó que los plásmidos fueron digeridos y linealizados por la enzima Sal I, al verse las bandas en el tamaño predicho para la linealización.

Adicionalmente, se realizaron reacciones de PCR usando los plásmidos recuperados como molde. Para estas PCRs se utilizaron los iniciadores FPH y RPH (cuadro 3.3) y el programa descrito en el cuadro 2.1. Para todas las reacciones de PCR se predijo un producto que debería apreciarse como una banda con un patrón de migración de una secuencia de ~600 pb.

Solo fue posible amplificar el producto del tamaño predicho del plásmido recuperado de la colonia 1(figura 3.9).

Los cambios de bases en la secuencia del plásmido pGST3 se comprobaron mediante secuenciación. El resultado de la secuenciación confirmó que se obtuvo la mutante K30A (figura 3.10).

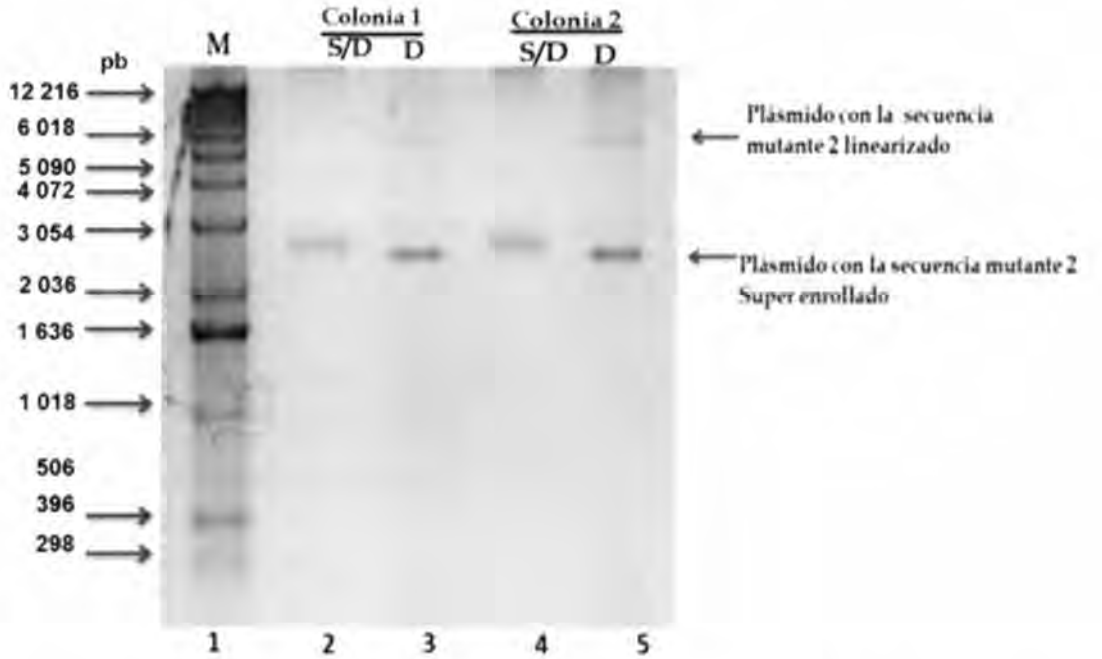


Figura 3.8. Digestión del plásmido con la secuencia del dominio PH mutante K30A.

Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los plásmidos digeridos con la enzima Sal I M (carril 1); Marcador de 1kb. Carriles 2-5: Plásmidos sin digerir y digeridos con la posible mutante K30A. S/D: Plásmido sin digerir. D. Plásmido digerido.

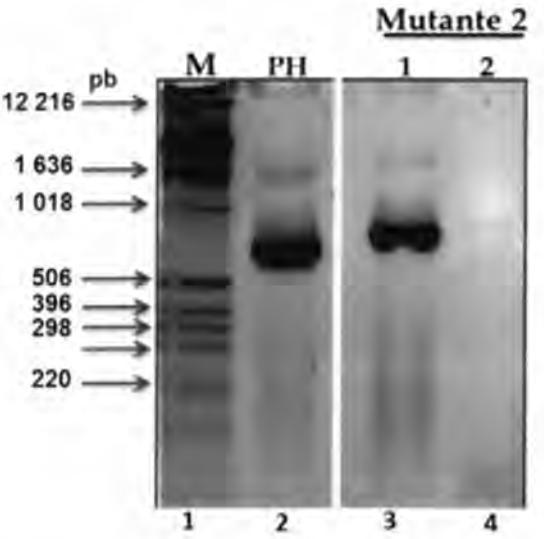


Figura 3.9. PCR de los plásmidos con la secuencia del dominio PH mutante K30A. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos de PCR correspondientes a los posibles dominios PH mutantes. Carril 1: Marcador de 1kb. Carril 2: Secuencia del dominio PH silvestre. . Carriles 3 y 4: productos de PCR con un tamaño esperado para la secuencia del dominio K30A.

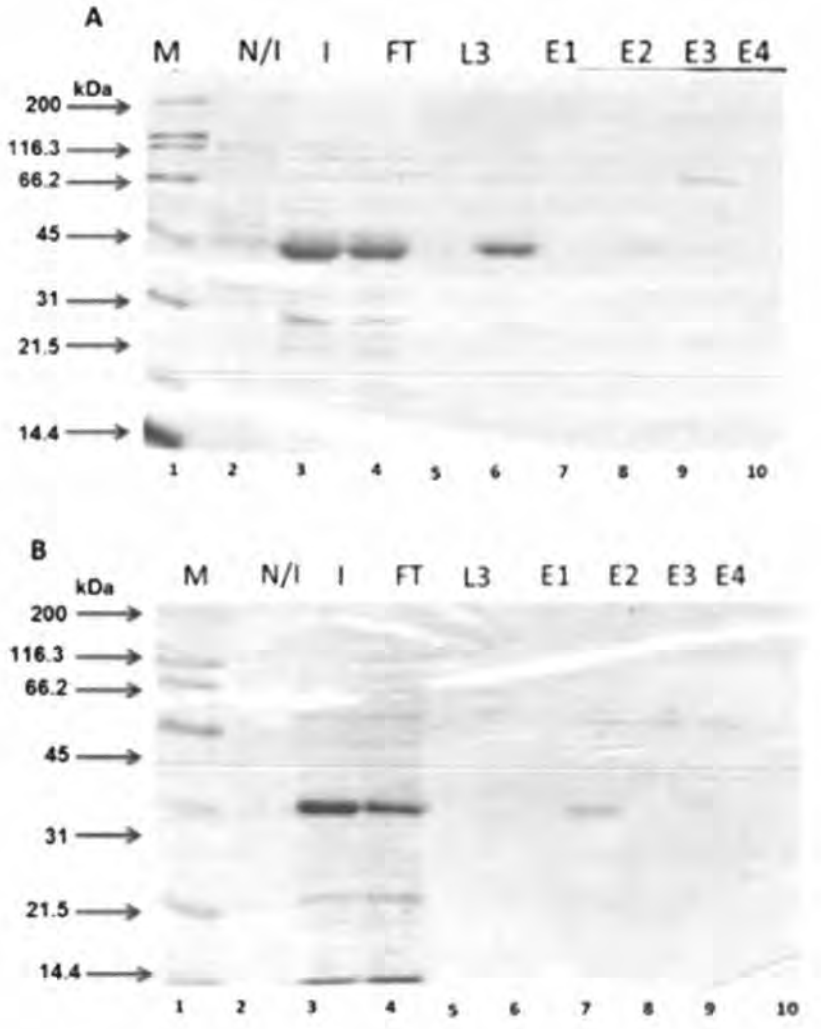
Posteriormente se repitió el mismo procedimiento con el resto de las mutantes, aunque solamente se pudo confirmar por secuenciación la obtención de las mutantes W36F y W36Y (figura 3.10).

```
                          10        20        30        40        50
Dominio PH silvestre :TLHGLQDDPDLQALLKGSQLLKVKSSSWRRERFYKLQEDCKTI
Dominio PH K30A      :TLHGLQDDPDLQALLKGSQLLAVKSSSWRRERFYKLQEDCKTI
Dominio PH W36F      :TLHGLQDDPDLQALLKGSQLLKVKSSSFRRERFYKLQEDCKTI
Dominio PH W36Y      :TLHGLQDDPDLQALLKGSQLLKVKSSSYRRERFYKLQEDCKTI
```

Figura 3.10. Alineamiento de secuencias con los dominios PH silvestre y mutantes. Alineamiento de secuencias con los residuos 9-51 de los dominios PH silvestre, K30A, W36F y W36Y. Las secuencias de nucleótidos obtenidas de las secuenciaciones fueron alineadas y traducidas a su respectiva secuencia de aminoácidos en el programa MUSCLE. Los residuos con fondo negro son aquellos donde hubo un cambio de aminoácido con respecto a la secuencia del dominio PH silvestre.

3.6 expresión y purificación de los dominios mutantes K30A, W36F y W36Y

Los plásmidos que codifican para las mutantes K30A, W36F y W36Y se insertaron en bacterias BL21 quimiocompetentes usando los protocolos descritos con anterioridad para el dominio silvestre y el mutante R40A. Posteriormente se indujo la expresión y los dominios se purificaron siguiendo las condiciones descritas previamente. La expresión de los dominios mutantes y las purificaciones fueron corroboradas utilizando la electroforesis en geles de poliacrilamida (figura 3.11).



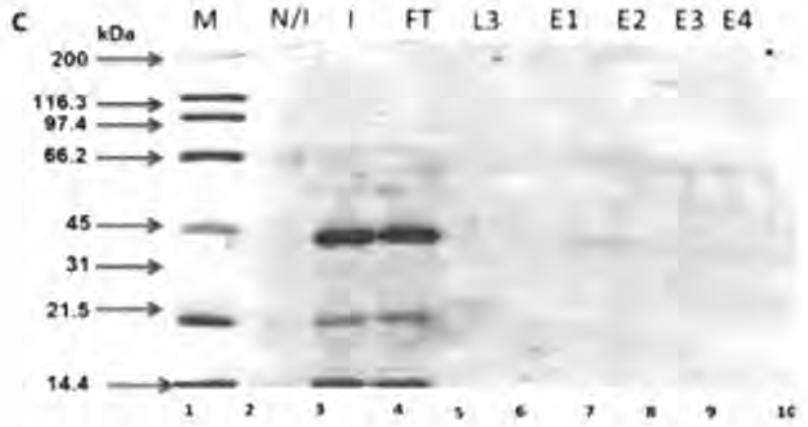


Figura 3.11. Purificación de los dominios PH silvestre y mutantes K30A, W36F y W36Y. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación del dominio PH K30A. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. Im (carril 3): extracto total de los dominios inducidos. Ft (carril 4): Filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9): eluciones con glutatión al 10mM. **B)** Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación del dominio PH W36F. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. Im (carril 3): extracto total de los dominios inducidos. Ft (carril 4): Filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9): eluciones con glutatión al 10mM. **C)** Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% que corresponde a la purificación del dominio PH W36Y. M (carril 1): marcador de masa molecular. N/I (carril 2): extracto de proteínas no inducido. Im (carril 3): extracto total de los dominios inducidos. Ft (carril 4): filtrado de proteínas a través de la resina sefarosa 4B. L3 (carril 5): lavado realizados con el amortiguador de extracción. E1-E4 (carriles 6-9): eluciones con glutatión al 10mM.

3.7 Inmunodetección de los dominios silvestre y mutantes

Para determinar la funcionalidad de los anticuerpos contra los dominios PH silvestre y mutantes, se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida y posteriormente un Western blot (figura 3.12). Los dominios PH silvestre y mutantes (R40A, K30A, W36 y W36Y) fueron cargados en el gel a tres concentraciones. El Western blot reveló bandas que corresponden a los dominios PH, confirmando que los anticuerpos si reconocen a su antígeno.

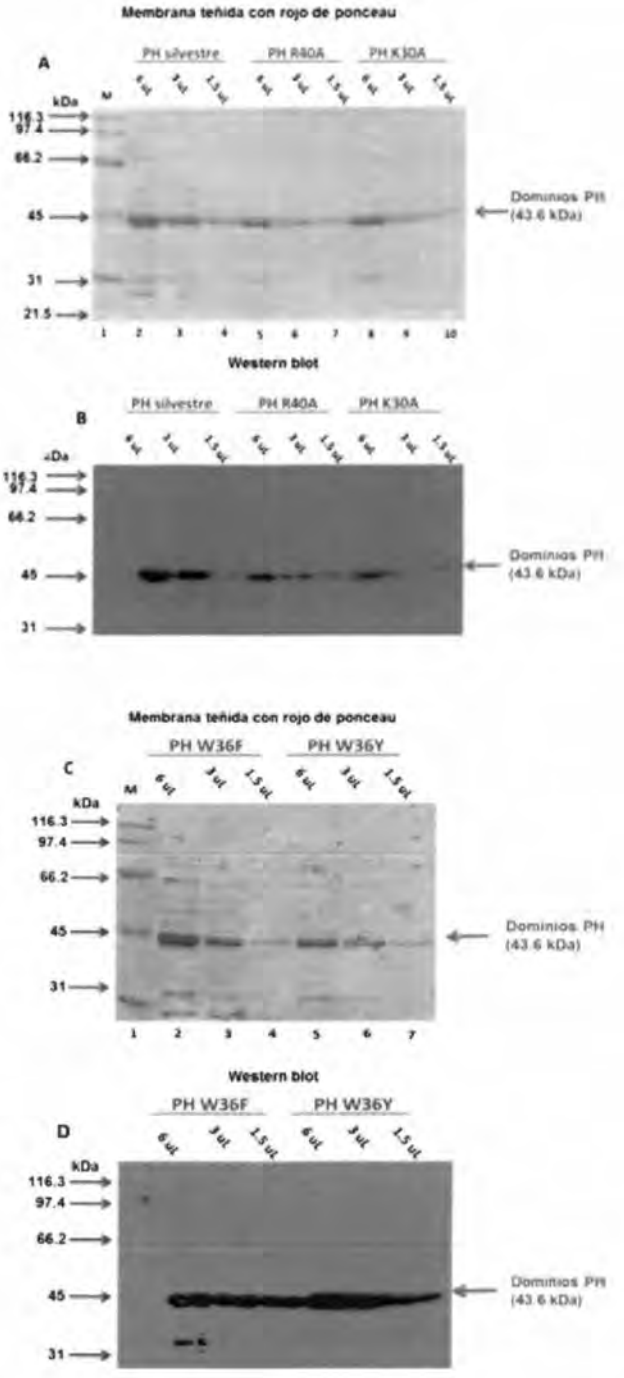


Figura 3.12. Inmunodetección de los dominios PH silvestre y mutantes en extracto crudo de proteínas. A) membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de ponceau para verificar que las proteínas fueron transferidas correctamente. Carriles 1-3: Diferentes concentraciones del dominio PH silvestre. Carriles 4-6: Diferentes concentraciones del dominio PH mutante (R40A) purificado.

B) Inmunodetección de los dominios silvestre y mutantes R40A y K30A en gradientes de concentración. **C)** membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de ponceau. Carriles 1-3: Diferentes concentraciones del dominio PH W36F. Carriles 4-6: Diferentes concentraciones del dominio PH W36Y. **D)** Inmunodetección de los dominios y mutantes W36F y W36Y dispuestos en gradientes de concentración.

Los anticuerpos generados en el laboratorio se probaron con los dominios previamente purificados. El resultado mostró que los anticuerpos reconocen a los dominios con mayor sensibilidad que la tinción con rojo de ponceau (figura 3.13).

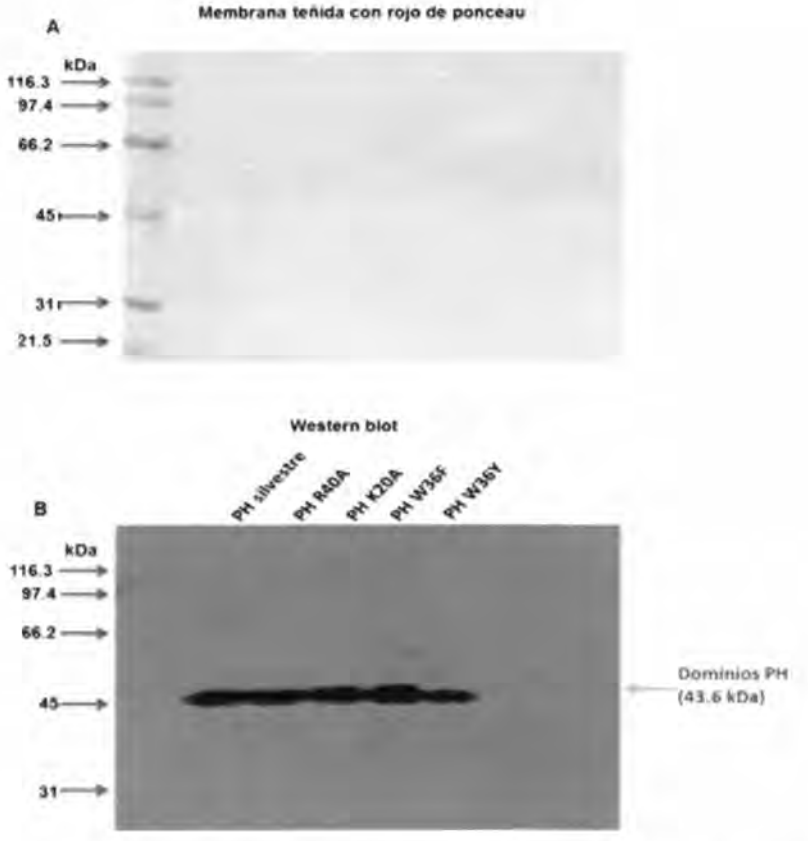


Figura 3.13. Inmunodetección de los dominios PH silvestre y mutantes en extracto purificado de proteínas. A) membrana teñida con rojo de ponceau. Carril 1: marcador de masa molecular. Carriles 2-6: dominios PH silvestre y mutantes purificados. **B)** Inmunodetección de los dominios silvestre y mutantes.

3.8 Fat blot de los dominios PH silvestre y mutantes

Después de realizar los Western blots y comprobar que los anticuerpos reconocían a los dominios PH, se realizaron los Fat blots para comprobar si los cambios de aminoácidos habían provocado un cambio en la especificidad del dominio silvestre (figura 3.13).

Mientras que el dominio silvestre se une fuertemente al $PI(4,5)P_2$ y más débilmente al PI(5)P, al $PI(3,4)P_2$ y al $PI(3,4,5)P_3$, el dominio R40A no reconoce a ningún fosfoinosítido (3.14-C). En el caso de la mutante K30A, el Fat blot muestra que puede unirse con una intensidad parecida al $PI(4,5)P_2$ y al $PI(3,5)P_2$ (3.14-D), mientras que lo hace más débilmente con el $PI(3,4,5)P_3$ (3.14-E).

La mutante W36F se unió a todos los fosfoinosítidos, aunque la señal parece ser menos intensa con los PIPs monofosfato y además parece interactuar con el ácido fosfatídico (PA). La mutante W36Y parece interactuar con el PA y reconocer a todos los fosfoinosítidos a excepción del PI(3)P, además esta unión parece ser más fuerte en el caso del PI(5)P, el $PI(4,5)P_2$ y el $PI(3,4,5)P_3$.

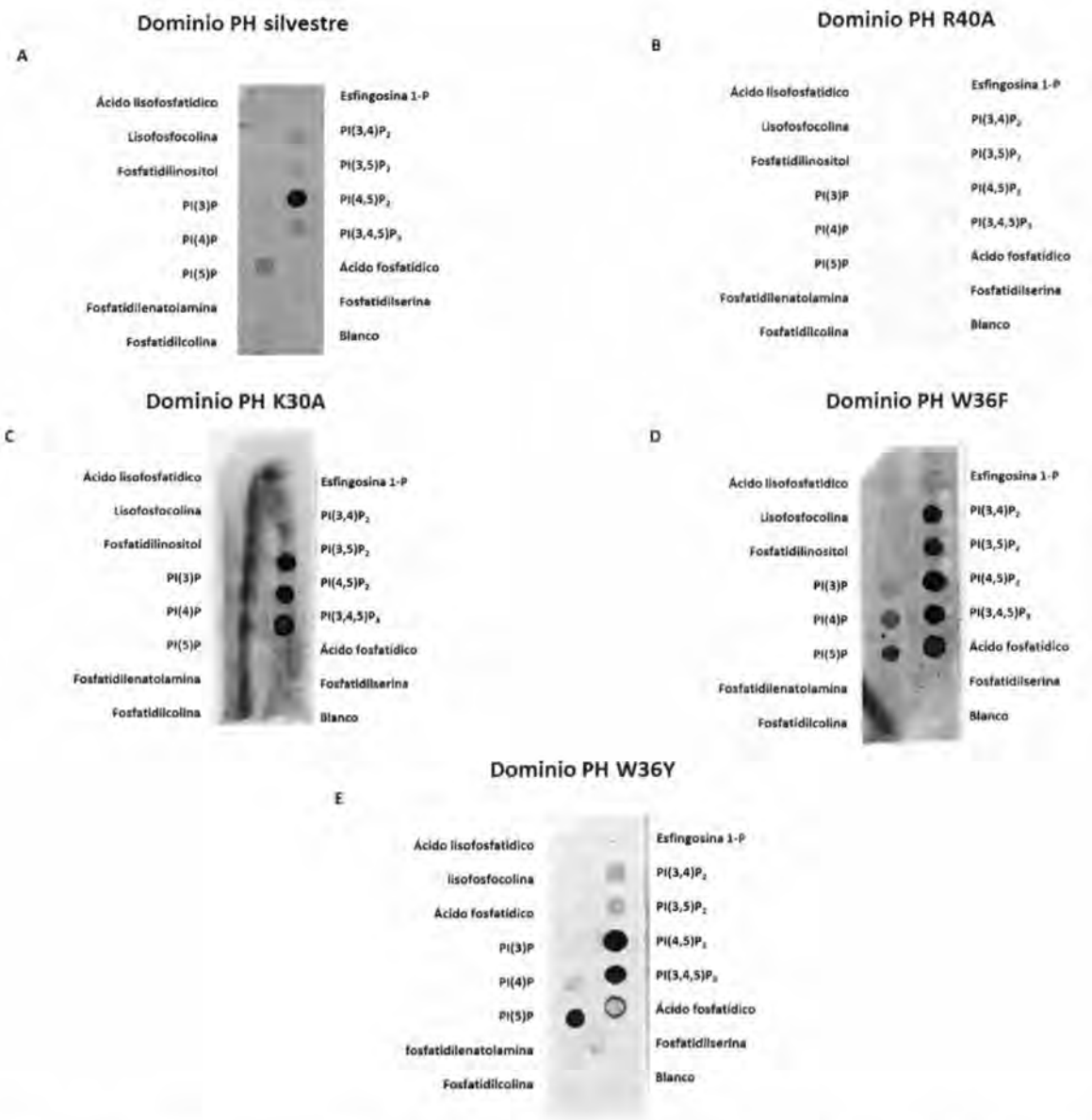


Figura 3.14. Determinación de la especificidad de los dominios silvestre y mutantes mediante ensayos de Fat blot. A) Fat blot del dominio PH silvestre. Este parece unirse al PI(5)P, $PI(4,5)P_2$, $PI(3,4)P_2$ y al $PI(3,4,5)P_3$. **B)** Fat blot del dominio PH R40A. Este no reconoce a ninguno de los fosfolípidos presentes en la PIP strip. **C)** Fat blot del dominio PH K30A. El dominio reconoció al $PI(4,5)P_2$, al $PI(3,5)P_2$ y más débilmente al $PI(3,4,5)P_3$. **D)** Fat blot del dominio PH W36F. El dominio interactuó con los siete fosfoinosítidos y aparentemente con el PA. **E)** Fat blot del dominio PH W36Y. El dominio parece interactuar con el PA y con todos los fosfoinosítidos menos el PI(3)P y esta unión parece ser más intensa en el caso del PI(5)P, el $PI(4,5)P_2$ y el $PI(3,4,5)P_3$.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

Existen diversos enfoques para mejorar ciertas características de una proteína, tales como su actividad catalítica, su afinidad o la tolerancia a inhibidores. Estos enfoques se pueden agrupar en tres principales grupos: el diseño racional, los métodos al azar y los métodos evolutivos.

En el diseño racional, basándose en conocimientos mecanisticos y estructurales se cambia la selectividad de un péptido, reemplazando ciertos aminoácidos por otros. No se necesita un complejo método de búsqueda para identificar aquella proteína que tiene las propiedades deseadas y las variables que se analizan son menores (Antikainen y Martin, 2005). Es por esto que se decidió utilizar el método racional para modificar la especificidad del dominio PH de la PLC-δ1 cambiando aminoácidos específicos y no haciendo uso de métodos como la mutagénesis al azar.

Existe evidencia que indica que la sustitución de un solo aminoácido en el dominio PH, puede alterar su unión al $PI(4,5)P_2$. Como ejemplo de esto se encuentra la mutante R40A del dominio PH de la PLC-δ1 de *Rattus novergicus* que no se une a ningún fosfoinosítido (Yagisawa, 1998). También está reportada una mutante de la PLC-δ1 de humanos, cuya sustitución de un solo aminoácido en la región correspondiente a su dominio PH (E57K) incrementó su velocidad de hidrólisis del $PI(4,5)P_2$ al aumentar su afinidad por este fosfoinosítido (Bromann *et al.*, 1997).

El alineamiento realizado para este trabajo y de otros previos, sugieren que los que los aminoácidos elegidos para ser sustituidos: K30, W36, R40 y S55 son indispensables para que se lleve a cabo la unión de $PI(4,5)P_2$ al dominio PH de la PLC-δ1 (Hirata *et al.*, 1998; Yagisawa, 1998; Lemon y Ferguson, 1995, 2000; Guo *et al.*, 2003, Tuzi, 2003). Estos estudios han utilizado sustituciones de distintos aminoácidos por alanina para determinar la importancia de los mismos en la interacción del dominio con el $PI(4,5)P_2$.

Estos mismos trabajos se han limitado a entender la manera en que el dominio PH se une al $PI(4,5)P_2$ y no han reportado si estas mutaciones han cambiado la especificidad del dominio, por lo que no se encontraron datos similares a los que se obtuvieron en el

presente trabajo.

Si bien el Triptófano 36 y la Serina 55 estaban conservados en un porcentaje menor al 50% en el alineamiento (figura 3.1), su elección se basó en el hecho de que el triptófano es el aminoácido de mayor masa molecular, por lo que al sustituirlo se esperaba que se indujeran cambios en la estructura del dominio.

Respecto a la Serina es interesante ver que en las estructuras primarias de las proteínas donde no estaba conservada, fue sustituida mayormente por la Treonina (2 veces) que es químicamente parecida, lo que pudiera sugerir cierta importancia de este residuo en el reconocimiento de los PIPs.

Los aminoácidos que se eligieron para reemplazar a aminoácidos nativos en el dominio PH silvestre, son aminoácidos con cargas positivas que son más afines a sustratos con cargas negativas. La Alanina es usada en estudios con mutantes debido a su carga neutra y tamaño promedio que no afecta la estructura secundaria, de esta manera se busca cambiar un poco la carga y la polaridad del sitio de unión.

El Glutamato se eligió por su carga negativa lo que también afectaría la carga del sitio de unión y quizás permitiría que un fosfoinosítido menos negativo pueda unirse a él, o bien que se rechace a aquellos fosfoinosítidos más electronegativos.

En el caso del Triptófano se eligieron Fenilalanina y Tirosina para sustituirlo porque ambos aminoácidos son química y estructuralmente similares a éste, pero más pequeños por lo que el sitio de unión podría albergar un fosfoinosítido de mayor tamaño.

5.2. Mutante K30A

La sustitución de la Lisina 30 del dominio PH de la PLC-δ1 dio como resultado que la mutante K30A se uniera a los fosfoinosítidos $PI(4,5)P_2$, $PI(3,5)P_2$ y débilmente al $PI(3,4,5)P_3$.

Se sabe que los sitios de reconocimiento de fosfoinosítidos contienen residuos con cargas positivas, ya que las interacciones con estos fosfolípidos se llevan a cabo entre las cargas negativas de los grupos fosfato y los residuos básicos del sitio de unión, aunque en la mayoría de los dominios analizados existe al menos un residuo aromático y el que más

aparece en las estructuras primarias de los dominios PH es el triptófano (Hyvonen *et al.*, 1995; Kavran *et al.*, 1998; Dantsker y Logothetis, 2007).

El residuo K30 parece ser necesario para el reconocimiento del grupo fosfato en el carbono 4 del anillo de inositol lo que explicaría el aparente cambio en la especificidad de la mutante K30A (Ferguson *et al.*, 1995). A diferencia de la lisina, la alanina no posee carga y es un aminoácido no polar (Betts y Rusell, 2003). Como se ha mencionado, las cargas juegan un papel fundamental en los dominios de unión a los PIPs.

Adicionalmente, el tamaño de ambos aminoácidos es muy diferente: la Alanina tiene una masa molecular de 89.09 Da y la Lisina de 146.19 Da. (figura 4.1) y es quizás debido a ambos factores que la mutante parece requerir de una mayor carga negativa para reconocer a los fosfoinosítidos, prefiriendo a aquellos que están fosforilados en la posición 5 del anillo de inositol.

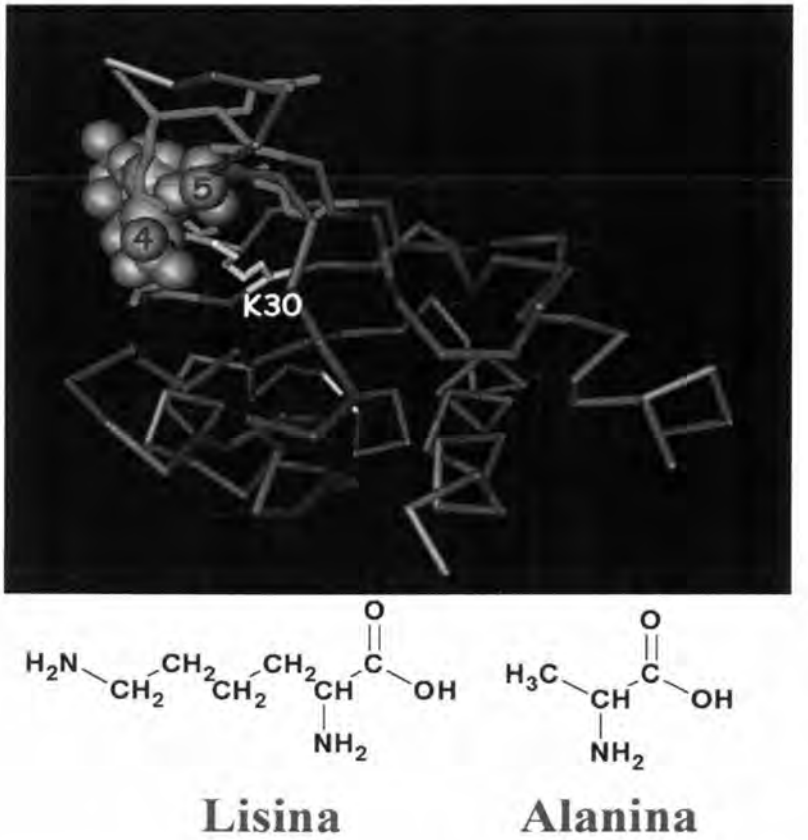


Figura 4.1. Posición de la Lisina 30 del dominio PH de la PLC-δ1 con respecto al anillo de

inositol. La Lisina 3° (amarillo) se encuentra cercana al fosfato en la posición 4 del anillo de inositol y más lejano al de la posición 5 (ambos resaltados con números en azul). En verde están resaltados los aminoácidos esenciales en el reconocimiento del $PI(4,5)P_2$ por parte del dominio PH. De naranja la molécula de IP_3 A un costado se observan las estructuras de los aminoácidos Lisina y Alanina respectivamente.

5.2. Mutante W36F

La mutante W36F fue capaz de unirse a las siete especies de fosfoinosítidos y al PA con mayor intensidad con respecto a la mutante W36Y.

El Triptófano 36 del dominio PH se encuentra implicado en el reconocimiento del fosfato en la posición 5 del anillo de inositol del $PI(4,5)P_2$, en conjunto con la Arginina 40 (Yagisawa, 1998; Lemon y Ferguson, 1995).

El Triptófano es el aminoácido de mayor masa molecular (204.23 Da.) y se considera que al sustituirlo por un aminoácido más pequeño pero químicamente parecido como Fenilalanina puede que provoque que el sitio de unión a los fosfoinosítidos sea mayor (figura 4.2). Esto podría provocar que se eliminen impedimentos estéricos que ayudan a discriminar a las otras especies fosfoinositidas del $PI(4,5)P_2$ y que quizás contribuyan a que sea necesaria una correcta orientación de los grupos fosfato, favoreciendo la interacción del $PI(4,5)P_2$ con el dominio PH silvestre (Kavran *et al.*, 1998). Puede que debido a esto, la mutante W36F parece ser capaz de unirse a un mayor número de PIPs.

La Fenilalanina tiene una masa molecular de 165.19 Da., pero además es más hidrofóbico que el Triptófano (Betts y Rusell, 2003)., lo que podría explicar que esta mutante pueda unirse también al PA, que es una molécula hidrofóbica.

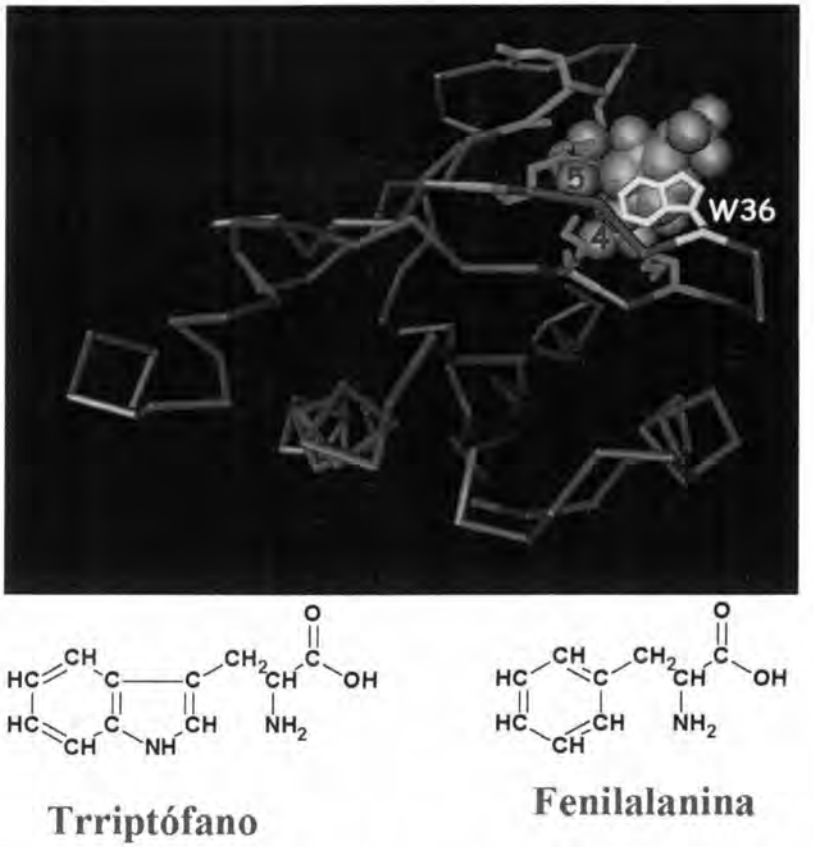


Figura 4.2. Posición del Triptófano 36 del dominio PH de la PLC-δ1 con respecto al anillo de inositol. El Triptófano está implicado en el reconocimiento del fosfato en la posición 5 del anillo de inositol. En verde están resaltados los aminoácidos esenciales en el reconocimiento del PI(4,5)P2 por parte del dominio PH. De naranja la molécula de IP_3 A un costado se observan las estructuras de los aminoácidos Triptófano y Fenilalanina respectivamente.

5.2. Mutante W36Y

La sustitución del Triptófano 36 por una Tirosina, provoco que el dominio mutante W36Y se uniera débilmente con el PA y también reconoció a todos los fosfoinosítidos con excepción del PI(3)P. Su unión con el PI(5)P, el PI(4,5)P_2 y el PI(3,4,5)P_3 parece ser más intensa.

La diferencia entre las mutantes W36F y W36Y pueden deberse a que, aunque ambos residuos son aromáticos, el grupo hidroxilo (OH) de la Tirosina hace que este aminoácido sea polar y más reactivo que la Fenilalanina (figura 4.3).

La Tirosina es mayor en tamaño (181.19 Da.) y puede que esta diferencia y la orientación de la carga negativa del OH favorezca la discriminación por los PIPs fosforilados en el carbono 3 del anillo de inositol (Betts y Rusell, 2003).

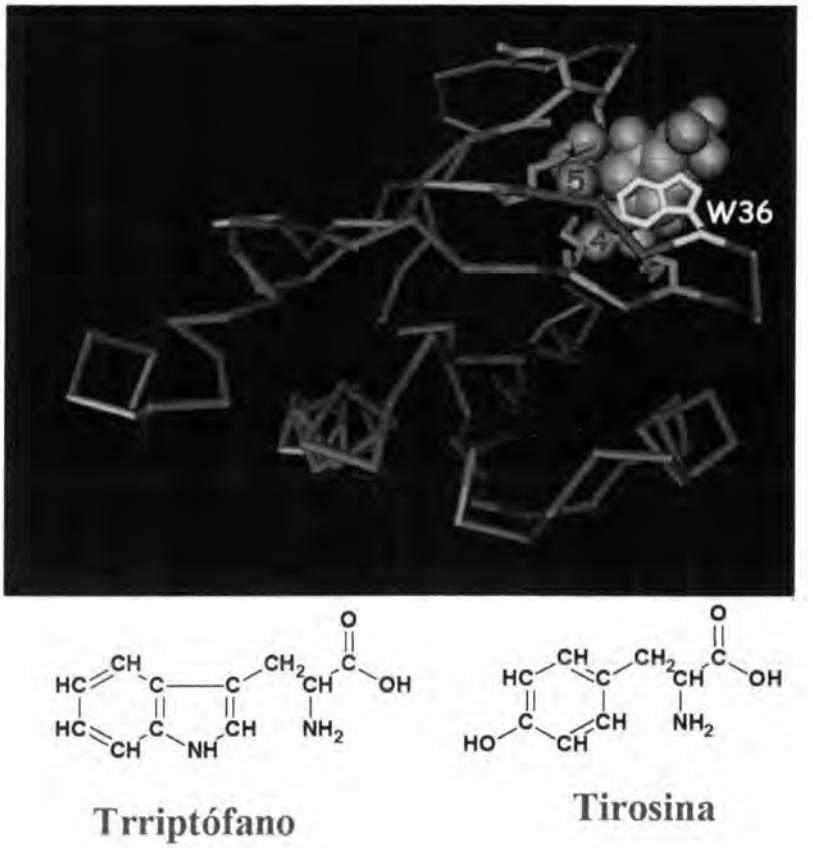


Figura 4.3. Posición del Triptófano 36 del dominio PH de la PLC-δ1 con respecto al anillo de inositol. El triptófano está implicado en el reconocimiento del fosfato en la posición 5 del anillo de inositol. En verde están resaltados los aminoácidos esenciales en el reconocimiento del $PI(4,5)P_2$ por parte del dominio PH. De naranja la molécula de IP_3 A un costado se observan las estructuras de los aminoácidos Triptófano y Tirosina respectivamente.

Ésta diferencia de especificidad también puede deberse a cambios en la estructura terciaria del dominio, es decir, cambios conformacionales en el dominio que permiten su interacción con una mayor cantidad de PIPs o con una aparente mayor fuerza que con otros, ya que algunos autores han sugerido la importancia de interacciones alostéricas que provocan cambios en la afinidad del dominio PH (Tuzi *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2005; Tanio y Nishimura, 2012; Tanio y Nishimura, 2013).

El hecho de que en los ensayos de Fat blot parezca existir interacción entre un dominio o proteína con los fosfoinosítidos no significa que esta interacción se lleva a cabo *in vivo* por lo que se deben hacer más pruebas para confirmarlo (Nayaran y Lemmon, 2006).

Incluso si se pueden corroborar los datos observados con otras técnicas *in vitro* es posible que al ser utilizadas in vivo los dominios no puedan unirse al fosfoinosítido que se desea observar debido a las interacciones del mismo con las proteínas de la región celular en la que éste se encuentra (Varnai y Balla, 2006).

CONCLUSIONES

Se eligieron cuatro aminoácidos para ser mutados por dos aminoácidos diferentes cada uno: Lisina 30, Triptófano 36, Arginina 40 y Serina 55. Estos cuatro aminoácidos elegidos son los que en el NCBI muestran etar en contacto con la molécula del fosfoinosítido.

Mediante una secuenciación se confirmó que se obtuvieron los dominios PH mutantes K30A, W36F y W36Y.

Se obtuvieron anticuerpos primarios que son capaces de reconocer a los dominios PH silvestre y mutantes y que pueden ser empleados para realizar técnicas de inmunodetección con dichos dominios.

El dominio PH K30A reconoció al $PI(4,5)P_2$, al $PI(3,5)P_2$ y más débilmente al $PI(3,4,5)P_3$. El dominio PH mutante W36F se unió a los siete fosfoinosítidos y aparentemente con el PA. El dominio PH mutante W36Y parece unirse al PA y con todos los fosfoinosítidos menos el PI(3)P y esta unión parece ser más intensa en el caso del PI(5)P, el $PI(4,5)P_2$ y el $PI(3,4,5)P_3$.

PERSPECTIVAS

Determinar la especificidad de los dominios mutantes mediante otro tipo de técnicas como el ensayo de liposomas o el recuento de centelleo líquido.

Determinar la afinidad de los dominios para cada fosfoinosítido que fueron capaces de reconocer.

Obtener el resto de las mutaciones que no se lograron conseguir, además de esto también realizar dobles o triples mutantes, así como mutar aminoácidos diferentes a los propuestos en el presente trabajo.

Probar la unión de los dominios a fosfoinosítidos *in vivo* mediante uso de técnicas inmunológicas o marcaje fluorescente.

BIBLIOGRAFIA

Antikainen N. M., Martin S. F. Altering protein specificity: techniques and applications. 2005. Bioorganic & Medicinal Chemistry 13: 2701–2716

Betts M.J., Russel R.B. I. Amino acid properties and consequences of subsitutions. Bioinformatics for Geneticists. 2003. Wiley.

Bromann P. A., Boetticher E. E. Lomasney J. W. A Single Amino Acid Substitution in the Pleckstrin Homology Domain of Phospholipase C δ1 enhances the Rate of Substrate Hydrolysis. 1997. The Journal of Biological Chemistry 272:16240-16246.

Dantsker A. R., Logothetis D. E. 2007. Molecular characteristics of phosphoinositide binding. European Journal of Physiology (2007) 455:45–53.

Ferguson K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J., Sigler, P. B. 1995. Structure of a high affinity complex between inositol 1,4,5-trisphosphate and a phospholipase C pleckstrin homology domain. Cell 83: 1037-1046.

Guo J., Wenk, M. R., Pellegrini, L., Onofri, F., Benfenati, F. and De Camilli, P.(2003). Phosphatidylinositol 4-kinase type IIalpha is responsible for the phosphatidylinositol 4-kinase activity associated with synaptic vesicles. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 100: 3995-4000.

Hirata M., Kanematsu T., Takeuchi H., Yagisawa H. Pleckstrin homology domain as an inositol compound binding module. 1998. The Japanese Journal of Pharmacology 76 (3): 255-263.

Hyvonen M., Macias M. J., Nilges M., Oschkinat H., Sarastel M., Wilmanns M. Structure of the binding site for inositol phosphatesin a PH domain. 1995. The EMBO Journal 14(19) :4676-4685.

Kavra J. M., Kleins D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoffi, S. J., Skolniki E. Y., Lemmon M. A. 1998. Specificity and Promiscuity in Phosphoinositide Binding by Pleckstrin

Homology Domains. The Journal of Biological Chemistry 273 (46): 30497–30508.

Lemmon M. A., Ferguson, K. M., O'brien R., Sigler, P. B., Schlessinger, J. 1995. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain. Proceedings of the National Academy of Sciences 92: 10472-10476.

Lemmon M. A., Ferguson, K. M., Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. 2000. Biochemical Journal. 350(1): 1–18.

Narayan K., Lemmon M. A. determining selectivity of phosphoinositide-binding domain. 2006. Methods 39: 122–133.

Yagisawa H., Sakuma, K., Paterson, H. F., Cheung, Allen, R. V., Hirata, H., Watanabei, Y., Hirata, M., Williams, R. L., Katan, M. Replacements of Single Basic Amino Acids in the Pleckstrin Homology Domain of Phospholipase C-d1 Alter the Ligand Binding, Phospholipase Activity, and Interaction with the Plasma Membrane. 1998. The Journal of Biological Chemistry 273: 417–424.

Yan J., Wen W., Xu W., Long J. F., Adams M. E., Froehner C. S., Zhang M. Structure of the split PH domain and distinct lipid binding properties of the PH–PDZ supramodule of a-syntrophin. 2005. The EMBO Journal 24: 3985–3995.

Tanio M., Nishimura K. Analysis of the phospholipase C-δ1 pleckstrin homology domain using native polyacrylamide gel electrophoresis. 2013. Analytical Biochemistry 431(2):106-14.

Tanio M., Nishimura K. Intramolecular allosteric interaction in the phospholipase C-δ1 pleckstrin homology domain. 2013. Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics 1834: 1034-1043.

Tuzi S., Uekama N., Okada M., Yamaguchi S., Saito H., Yagisawa. 2003. Structure and Dynamics of the Phospholipase C-1 Pleckstrin Homology Domain Located at the Lipid Bilayer Surface. The Journal of Biological Chemistry 278(30): 28019 –28025.

Várnai P., Balla T. Live cell imaging of phosphoinositide dynamics with fluorescent protein domains. 2006. Biochimica et Biophysica Acta 1761:957–967.

ANEXOS

Mutagénesis sitio-especifica del dominio PH de la PLC-δ1

Para conocer las condiciones óptimas de las PCRs se probaron diferentes condiciones de temperatura y tiempos de los ciclos y distintas concentraciones de magnesio (Mg). Con respecto a los tiempos y temperaturas se llegó al establecimiento de la programación del termociclador descrita en los materiales y métodos.

Con una concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$ se lograron amplificar los fragmentos de las PCR 1 y 2 de las ocho mutantes a excepción del segundo fragmento de la mutante K30A, el segundo fragmento de la mutante S55A y ambos fragmentos de la mutante S55E que se obtuvieron con concentraciones de 2 mM de de $MgCl_2$ (figura A1). Se obtuvieron las secuencias completas de las mismas en la PCR 3. Esto se comprobó realizando las correspondientes electroforesis en geles de agarosa al 2.5% (figura A2).

Para estos productos se predijo un tamaño de ~ 600pb. Aunque hubo amplificación en todas las PCR, las más eficientes fueron las que corresponden a las mutantes K30R, S55A y S55E.

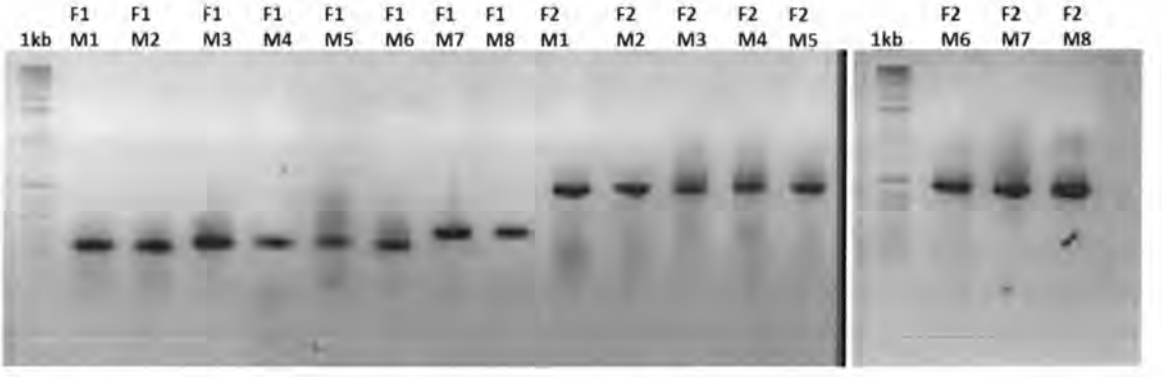


Figura A1. PCRs 1 y 2 para obtener los fragmentos de las mutantes 2-8. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % de las PCR 1 y 2 para obtener los fragmentos de las 8 mutantes. 1: Marcador molecular de 1kb. F1: fragmento 1 (producto de la PCR 1). F2: fragmento 2 (producto de la PCR 2). M1: mutante K30R. M2: mutante K30A. M3: mutante W36F. M4: mutante W36Y. M5: mutante R40K, M6: mutante R40H. M7: mutante S55A. M8: mutante S55E.

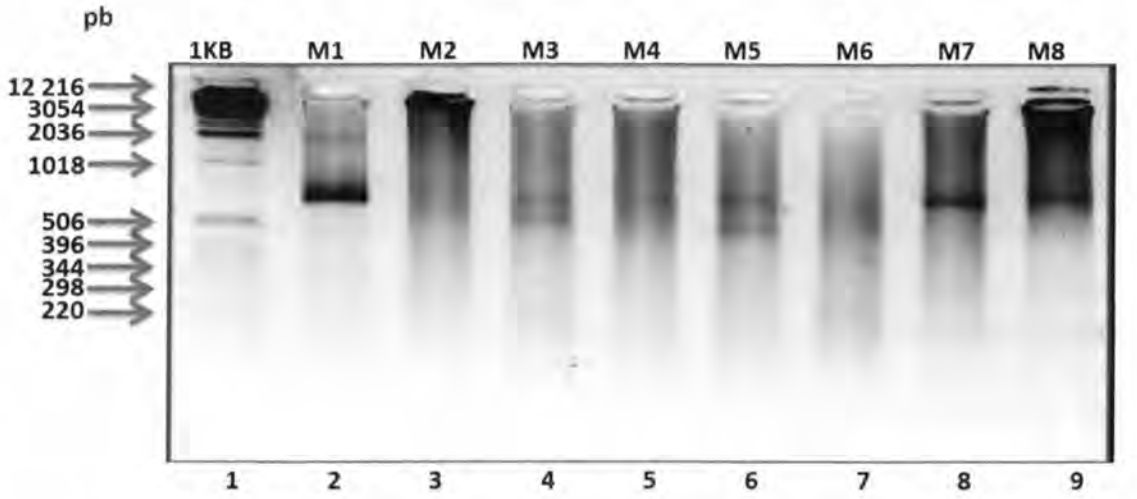


Figura A2. PCRs 3 para obtener las mutantes completas. Electroforesis en gel de agarosa al 2.5 % de las PCR 3 para obtener los fragmentos completos de las secuencias de las mutantes 2-8. Carril 1: Marcador molecular. Carriles 3-9 PCR 3 de las mutantes 1-8 respectivamente. M1: mutante K30R. M2: mutante K30A. M3: mutante W36F. M4: mutante W36Y. M5: mutante R40K, M6: mutante R40H. M7: mutante S55A. M8: mutante S55E.

Ligación de las secuencias mutantes en el vector de clonación Pgem-T Easy

Una vez amplificada la secuencia que codifica a la mutante 1 (K30R) se ligó al vector pGem-T Easy para posteriormente transformar bacterias con el producto la reacción de ligación. Para seleccionar la clona con la secuencia se realizaron minipreps a distintas colonias, estos se observaron en geles de agarosa al 1% (figura A3). Ya que se comprobó que se había obtenido ADN plasmídico, este se digirió con la enzima ECORI y los productos de la digestión se observaron en geles de agarosa al 2.5%. Solo fueron digeridas las muestras de las colonias 2, 7, 9 y 17, sin embargo ninguna de ellas tenía un inserto con el tamaño correspondiente al de la secuencia de la mutante 1 (figura A4).

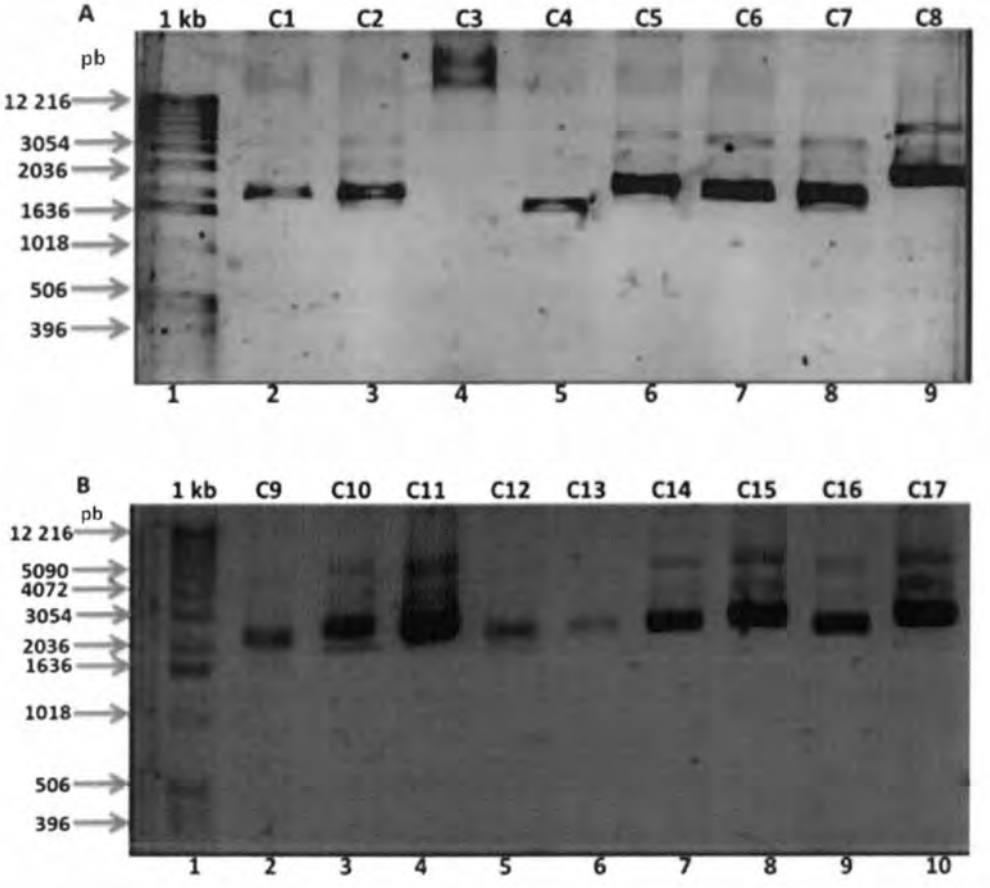


Figura A3. Recuperación del plásmido con la secuencia del dominio PH mutante K30R. A. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de las minipreps realizadas con la ligación de la mutante 1 (K30R). Carril 1: Marcador molecular de 1 Kb. Carriles 2-9: Minipreps de las colonias C1-C8. **B**. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% de las minipreps realizadas con la ligación de la mutante 1 (K30R). Carril 1: Marcador de 1 Kb. Carriles 2-10: Minipreps de las colonias C1-C8.

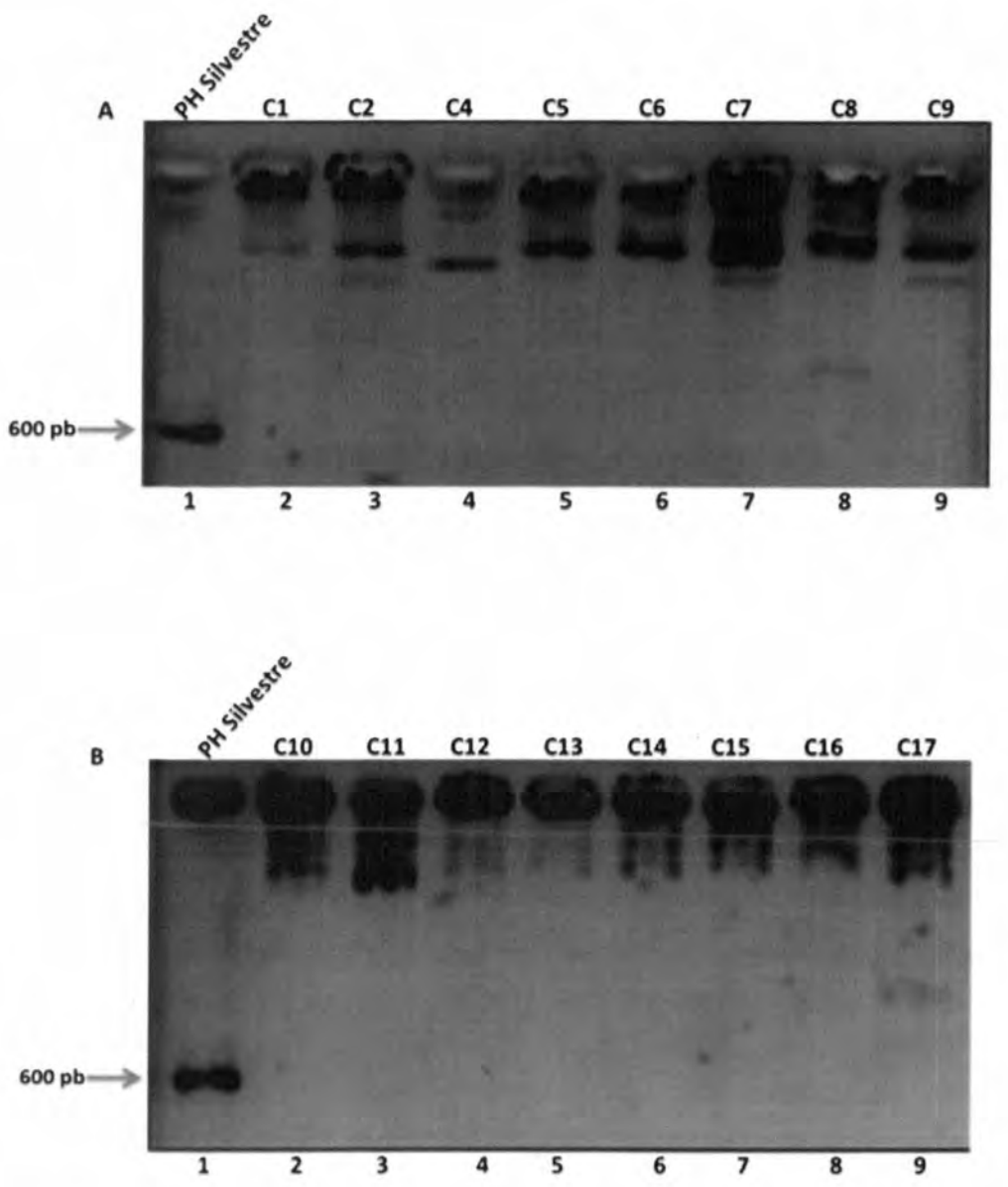


Figura A4. Digestión del plásmido con la secuencia del dominio PH mutante K30R. Electroforesis en gel de Agarosa al 2.5% de las digestiones a las minipreps hechas con la enzima ECOR1. **A** Carril 1: Secuencia PH silvestre. Carriles 2-9: digestiones de las minipreps C1-C8 (excepto C3). **B**. Carril 1: Secuencia PH silvestre. Carriles 2-9: digestiones de las minipreps C10-C17.