

Tesis Doctoral

Estudio funcional y estructural de las quimerinas, una familia de receptores de DAG y esteres de Forbol con actividad de Rac-GAP

Coluccio Leskow, Federico

2005

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Coluccio Leskow, Federico. (2005). Estudio funcional y estructural de las quimerinas, una familia de receptores de DAG y esteres de Forbol con actividad de Rac-GAP. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Coluccio Leskow, Federico. "Estudio funcional y estructural de las quimerinas, una familia de receptores de DAG y esteres de Forbol con actividad de Rac-GAP". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2005.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Tesis de Doctorado

Estudio Funcional y Estructural de las Quimerinas, una Familia de Receptores de DAG y Esteres de Forbol con Actividad de Rac-GAP.

Federico Coluccio Leskow

Director:

Dr. Marcelo G. Kazanietz

Center for Experimental Therapeutics, University of Pennsylvania School of Medicine

Junio 2005

Resumen

Estudio Funcional y Estructural de las Quimerinas, una Familia de Receptores de DAG y Esteres de Forbol con Actividad de Rac-GAP

Las quimerinas son una familia de GAPs (GTPase Activating Proteins) específicas para la familia de proteínas de Rac, reguladas por el segundo mensajero diacilglicerol (DAG) y los ésteres de forbol. En mamíferos los genes CHN1 (o α) y CHN2 (o β) codifican para las cuatro isoformas conocidas, α 1 y β 1 presentan un dominio C1 y un dominio de GAP, mientras que α 2 y β 2 poseen un dominio adicional SH2. En el primer capítulo de este trabajo se muestra que el gen β codifica para al menos 3 nuevas isoformas. La resolución de la estructura cristalográfica de β 2-chimaerin revela que ésta se encuentra autoinhibida, con los dominios C1 y GAP bloqueados estéricamente. En el capítulo segundo se propone un mecanismo de activación por lípidos para β 2-chimaerin. Se demuestra que es necesaria la unión del ligando al dominio C1 y la interacción con fosfolípidos de membrana para la activación del GAP. En el tercer capítulo se muestra que el dominio SH2 de β 2-chimaerin es capaz de unir proteínas fosforiladas en tirosina y se identifican tres de estas proteínas. En el capítulo cuarto se reporta el clonado y caracterización de z-chimaerin, el producto del único gen de quimerinas presente en el pez cebra. Esta proteína posee características similares a las de mamíferos y se expresa de forma materna y zigótica a lo largo del desarrollo embrionario. En el último capítulo se estudia la función de z-chimaerin en el desarrollo embrionario. Se determinó que su actividad de GAP es necesaria en la capa sincitial del saco vitelino para regular el movimiento de epíboli.

Palabras claves: quimerinas, Rac, ésteres de forbol, DAG, zebrafish, z-chimaerin, gastrulación, epíboli.

Abstract

Structural and Functional Study of Chimaerins, a Family of DAG and Phorbol Esters Receptors with Rac-GAP Activity

Chimaerins are a family of GAPs (GTPase Activating Proteins) specific for the Rac small GTPases regulated by the second messenger diacylglycerol (DAG) and the phorbol esters. In mammals the genes CHN1 (or α) and CHN2 (or β) encode the four known isoforms, α 1 and β 1 that possess a C1 and a GAP domain, and α 2 and β 2 that have an additional SH2 domain. The first chapter describes the existence of at least three novel β isoforms. The 3-D structure of β 2-chimaerin reveals that it is autoinhibited with the C1 and GAP domains sterically blocked. In the second chapter a mechanism for lipid activation of β 2-chimaerin is proposed. In the third part of this thesis it is shown that the SH2 domain of β 2-chimaerin binds phosphotyrosine proteins. Three proteins that interact with β 2-chimaerin were isolated. The fourth chapter reports the cloning and characterization of z-chimaerin, the product of the only chimaerin gene in the zebrafish. This protein is similar to the mammalian isoforms and it is maternally and zygotically expressed during embryogenesis. In the last chapter we analyzed the function of z-chimaerin during early development and found that its GAP activity is necessary in the yolk syncytial layer for the regulation of epiboly.

Keywords: chimaerins, Rac, phorbol esters, DAG, zebrafish, gastrulation, epiboly.

Dedicada a Roque Coluccio y Lucas del Moral

En primer lugar le quiero agradecer a Marcelo Kazanietz por estos cinco años de trabajo y amistad. Marcelo fue y será un buen mentor, pero sobre todo una magnífica persona que me apoyó y ayudó siempre.

Thanks to all the people that contributed with this thesis, Dr. J. H. Hurley, Dr. B. Canagarajah, Dr. B. Valdez, Dr. J. R. Conejo-García, Dr. C. Yang, H. Wang, M. Pack, M. C. Mullins, B. Holloway, Dr. C. Slamovits N. Lewing and Dr. M. Chou.

Next I have to thank the entire Kazanietz lab. When I arrived, five years ago things were a lot different than they are now but it always been a nice team. With Marcelo as the coach, the team was starting with María José Caloca organizing the defense (in fact, if there is still some order in the lab it is because we haven't had time to screw up what she left) and María Laura García Bermejo in the middle (always in the middle talking and talking). On the Sides, the quiet and precise Terujiko Fujii and Pilar Eroles and in the front HongBin Wang always focused on a "goal". The team started to change rapidly, Yuichi came to replace Terujiko giving more speed to the attack, and soon Veronica would bring to the team the pause (to drink some mates). The team kept growing into the full team we have today. In between, Jose Luis Oliva (Pepe), Pablo Lorenzano, Natalia Fernandez, Cristobal Reina, Julie Wang, Laura Mauro, Paula Ruibal, Ernesto Diaz, Lucia Sanchez and Alejandro Urtreger (el Lalo), came to visit us making the lab a greater place to work. The actual team is organized with numbers and colors and is very complicated and heterogeneous. It starts with myself in red as the number one; number two is John always leaving his electronic gadgets that make noise unattended; three is the sweet and cute Erin Griner (in pink of course); Anitilde comes next always ready to have fun (or have a surgery); The Japanese corner is a place full of people that don't complain (and stuff that nobody wants). Shino and Gen Nakagawa share everything including the bench and the orange tape; Pepe likes the ABP coffee so much that he came back to stay for a postdoc and to be number 6 in gray; The yellow HongBin Wang is next, more focused than ever; at the end of the lab Francesca Colón plays some reguetón for Chengfen and Liquin to dance; the "small benches" are populated by the "lab specialists" Jing and Ying (believe me that they manage to pronounce it differently) and by "Philadelphia's most wanted" Soledad Sosa (la Puntana).

I want to thank in particular HongBin who has been a great colleague and friend all these years.

When Yuichi came it was very hard to communicate, but with patience and a pencil and paper we could understand each other very well and became very good friends. I want to

thank him for all the good times we spent together and the soccer we played and to his wife and daughters Yukari, Yuki and Miki. They showed me that it doesn't matter where you were born or the language you speak to love one another.

Thanks Shino for being so nice to everybody.

Thanks Gen for everything, especially for the cooking together. Your pizza will be a revolution in Japan.

Thanks Erin for all the proofreading, the lab dancing, the sexual harassment and the nice company every day at the lab.

La Pilarica me sacó a pasear por Philly apenas llegué. Gracias a ella conocí la ciudad, la noche, los bares y a Caro que es lo único de lo anterior que todavía me gusta cada día más. Nos hicimos buenos amigos y espero que salgamos de tapas pronto por Valencia.

Gracias Pepe por tu sabiduría y tus consejos.

Gracias Anita por ser tan buena y estar siempre lista para una guerra de hielo (que siempre se desvirtúa y termina con etanol 70%)

La mejores guerras han sido con Verónica. Si bien parecía dulce y buenecita tenía el gatillo del "bombero loco" fácil. A Vero le estaré siempre muy agradecido por todos los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Un agradecimiento muy especial a Claudio Slamovits por la ayuda con los análisis filogenéticos.

Gracias Omar por toda tu ayuda y el "empujón" que me diste para dar este paso.

Gracias a Ana Bondia por la ayuda desde Buenos Aires y a mi director de estudios Alberto R. Kornblihtt.

Special thanks to Beth Holloway for all the help with the injections. I would also like to thank everyone in the Mullins Lab and the people in the fish facility.

Soccer has been a very important part of the Philly experience. Thanks to the Philadelphia Falcons and the Penn Economics Team. Penn Econ has been a great place to meet a lot of people, some of them among my best friends. Thanks George, Carlos, Sid, Manuel, Andrea, Debe, Slow, Pibe, "il mago", and all the team.

Special thanks to Massi, the founder and the mastermind of the team (even now from the dark). Grazie per tutto quello che abbiamo fatto insieme, per le lezioni di italiano, per le melanzane alla parmiggiana e i tortelloni toscani (quelli con le patate e il ragu'). Grazie anche per il ristorante cinese che abbiamo ormai chiamiamo "il cino di Massi"

I made a lot of friends in Philly and it will be hard not to forget any. Thanks Marco “il bello”, Francesca “di Massi”, Dermot (also known as “Termo”), Cristina “la italiana”, Aaaaagathe and Jonathan, Andreita “il dolce”, Peter “el gitanillo de Seattle” and Esther and all the rest for all fun and support

La familia de Philadelphia estaba básicamente formada por hispanohablantes. Es difícil agradecerle a todos, pero acá va un intento: Gracias Sole, Nayla, Gabi, Martelo, Francesca “Lecce”, El uruguayo Enestor, Jose Calatayud, la Laurita, Naty, Juan y Daniela, Jose Asturias, Mariano y Leti, Fabián y Ceci, Pablo y Ana Maria, Pedrito esperma y Pablo.

Las primeras dos noches en Philly las pase en casa de Paula, no es mi intención agradecerle cinco años después, pero desde entonces Polín ha sido una gran amiga durante todo este tiempo.

Luego le tocó el turno a Fabiana con quien fuimos roomates por casi ocho meses. Fabi, me gustó mucho vivir con vos, te quiero mucho y me alegra verte feliz con Scott y Lucia.

La época “Juan y Mariana” se caracterizó por varias cosas, pero la más notoria fue llegar tarde a todos lados, cosa que yo nunca estuve acostumbrado. Gracias Peres por todos momentos fantásticos vividos en Philly y por su cariño desde Vermont.

El final de mi tesis se caracterizó por varias cosas: mate con alfajor a las 6, plaistaichon, cena en el “chino de Massi” o la luppe, Fanchop (o rubia de verano) y mucha alegría. Todo con la grata compañía del científico formerly known as Martín Riccomagno.

Gracias Nacho por ser lo más cercano a un hermano que conozco.

Gracias a Hoch y toda la banda de Pittsburgh: Ceci, Chuchu, Laura, Ari, Gabi, Martin y Marianita.

Gracias mis amigos de siempre Romu, Wen, Gianni y Roberto.

Si tengo que agradecer a mis amigos, no puedo dejar de agradecerle a mi mejor amiga Emma, a mi ahijada Elena y a sus papis, Mir y Jan. Los quiero mucho y me hacen muy feliz.

Gracias a las tres Cecílias, Juan Antonio, Raquel, Iosu y su familia, Lucia y Mario, Tito y Lucia y a Doña Andresa por todo el cariño.

Gracias a mis padres y hermanas que amo con todo y que se tuvieron que conformar con tenerme lejos. Gracias a Luciana, Josefina, Estefania y Carla por esta relación tan linda que tenemos. Gracias Mamá por el apoyo incondicional a todos.

Gracias a Carolina, por estos cinco años de compañía, amistad y amor.

Parte de los resultados aquí presentados, han sido publicados en los siguientes trabajos:

Federico Coluccio Leskow, Beth A. Holloway, HongBin Wang, Mary C. Mullins and Marcelo G Kazanietz. z-chimaerin, the zabrafish homologue of mammalian chimaerins regulates epiboly progression during zebrafish gastrulation via Rac inhibition. (Enviado para publicación)

HongBin Wang, Chengfeng Yang, **Federico Coluccio Leskow**, Jing Sun, Bertram Canagarajah, James H. Hurley, and Marcelo G. Kazanietz. Linking diacylglycerol signaling to the Rac GTPase: C1-domain-mediated membrane targeting of β 2-chimaerin as a mechanism for Rac inactivation. (Enviado para publicación)

Chengfeng Yang, Ying Liu, **Federico Coluccio Leskow**, and Marcelo G. Kazanietz. Rac-GAP-Dependent Inhibition of Brest Cancer Cell Proliferation β 2-chimaerin. **J Biol Chem.** 2005 Apr 29; [Epub ahead of print].

Bertram Canagarajah, **Federico Coluccio Leskow**, Jonathan Yew Seng Ho, Harald Mischak, Layla F. Saidi, Marcelo G. Kazanietz, and James H. Hurley. Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, β 2-chimaerin. **Cell.** 2004 Oct 29;119(3):407-18.

I- Introducción

I.1 El DAG y sus receptores

a. El segundo mensajero diacilglicerol (DAG) y los ésteres de forbol	15
b. Moléculas receptoras de DAG y ésteres de forbol y los dominios “C1”	16
c. La proteína quinasa C (PKC)	19
d. Unc-13, las isoformas de Munc-13 y Dunc-13	21
e. RasGRPs	22
f. Quimerinas o “chimaerins”	23
g. El dominio C1 en las quimerinas	24
h. El dominio de GAP de las quimerinas	28
i. El dominio SH2 de las quimerinas	29

I.2 Pequeñas proteínas G monoméricas

a. La superfamilia de Ras	30
b. La familia Rho	33
c. Factores intercambiadores de GDP/GTP o GEFs	34
d. Proteínas que activan la actividad GTPasa o GAPs	36
e. Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina o GDIs	37
f. Señalización por proteínas de la familia de Rho	38
g. Las proteínas de la familia de Rho reorganizan el citoesqueleto	39
h. Proteínas de la familia Rho y cáncer	41

I.3 Proteínas de la familia Rho y el desarrollo embrionario

a. Desarrollo temprano; gastrulación	43
b. Desarrollo del sistema nervioso	46
c. <i>Danio rerio</i> (zebrafish) como modelo de desarrollo embrionario	47
d. Oligómeros antisentido “morfolinos”	48

II Métodos

II.1 Cultivo de células

a. Líneas celulares	51
b. Transfecciones transientes	57
c. Infecciones con adenovirus	51
d. Obtención de lisados celulares para los ensayos de unión a GST- β 2-chimaerin	52
e. Fraccionamiento subcelular	52
f. Inmunofluorescencias	52
g. Sincronización del ciclo celular	53
h. Inmunoprecipitaciones	53

II.2 Cultivo de bacterias

a. Transformación de bacterias	54
b. Producción de proteínas recombinantes	54

II.3 Construcción, clonado y amplificación de ADN recombinantes

a. Minipreparación de ADN plasmídico	55
b. Preparaciones a gran escala de ADN plasmídico	55
c. Geles de agarosa nativos	55
d. Cuantificación de ADN	56
e. Digestión de ADN con enzimas de restricción	56
f. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	56
g. Reacciones de ligación y transformación	56

II.4 Análisis de proteínas

a. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS)	57
b. Westerns blot	57
c. Tinción de Coomassie	57
d. Ensayo de medición de los niveles de Rac y Cdc42-GTP in vivo	58
e. Ensayos de retención de proteínas en columnas	58
f. Ensayos de unión a ésteres de forbol	59

II.5 Zebrafish

*a. Recolección de embriones*_____59

*b. Síntesis de sondas de ARN*_____60

*c. “Morfolinos”*_____60

*d. Síntesis de ARN mensajeros*_____60

*e. Microinyecciones*_____60

*f. Hibridizaciones in situ*_____61

*g. Fotografías y procesamiento de imágenes*_____63

II.6 Análisis bioinformático

*a. Búsqueda y alineación de secuencias*_____64

*b. Análisis filogenético*_____64

III Capítulo Primero: Análisis de la estructura del gen CHN2 y expresión de las distintas isoformas de β -chimaerin.

III.1 Objetivos_____66

III.2 Resultados

*a. Expresión de distintas isoformas de quimerinas en tejidos de ratón*_____67

*b. Expresión de quimerinas en distintas líneas celulares*_____70

III.3 Conclusiones_____72

IV Capitulo Segundo: Mecanismo de activación por lípidos de β 2-chimaerin

IV.1 Objetivos_____76

IV.2 Resultados

*a. Resolución de la estructura cristalográfica de β 2-chimaerin*_____77

<i>b. Análisis por mutación de la unión a ésteres de forbol de β2-chimaerin</i>	81
<i>c. Análisis de la actividad de Rac-GAP de las SUPER-chimaerins</i>	85

IV.3 Conclusiones	89
--------------------------	----

V Capítulo Tercero: Búsqueda de proteínas que interactúan con el dominio SH2 de β 2 chimaerin

V.1 Objetivos	94
----------------------	----

V.2 Resultados

<i>a. Obtención de las proteínas recombinantes fusionadas a GST</i>	95
<i>b. Obtención de los lisados celulares</i>	96
<i>c. Proteínas fosforiladas en tirosina interactúan con el dominio SH2 de β2-chimaerin</i>	97
<i>d. Identificación de las proteínas fosforiladas en tirosina que interactúan con β2 chimaerin</i>	99
<i>e. C23-nucleolin</i>	101
<i>f. Nucleolin co-precipita con GST-β2-chimaerin</i>	102
<i>g. Nucleolin interactúa con chimaerin durante la mitosis</i>	104
<i>h. Unión in vitro de distintas porciones de nucleolin con β2-chimaerin</i>	105
<i>i. G3BP (RasGAP SH3 Binding Protein)</i>	106
<i>j. Co-inmuno precipitación de G3BP1 con β2-chimaerin</i>	107

V.3 Conclusiones	110
-------------------------	-----

VI Capítulo Cuarto: Clonado y caracterización de las quimerinas en el pez cebra (zebrafish)

VI.1 Objetivos	113
-----------------------	-----

VI.2 Resultados

a. *Identificación y clonado de las quimerinas de zebrafish*_____ 114

b. *Expresión de z-chimaerin durante el desarrollo embrionario*_____ 118

c. *Análisis de unión a ésteres de forbol de z-chimaerin*_____ 121

d. *Translocación de z-chimaerin en respuesta a PMA*_____ 122

e. *z-chimaerin tiene actividad de Rac-GAP*_____ 122

VI.3 Conclusiones_____ 125

VII Capítulo Quinto: Estudio de la función de quimerinas durante el desarrollo embrionario temprano en el pez cebra (zebrafish)

VII.1 Objetivos_____ 127

VII.2 Resultados

a. *z-chimaerin regula la actividad de Rac in vivo durante el desarrollo embrionario*_____ 128

b. *Clonado de la proteína Rac1 de zebrafish*_____ 129

c. *Expresión de zRac1 durante el desarrollo embrionario*_____ 130

d. *z-chimaerin regula a zRac1 durante el desarrollo embrionario*_____ 131

e. *z-chimaerin es esencial durante el desarrollo embrionario*_____ 133

f. *El movimiento de epíboli progresa más rápido en los embriones knock-down*__ 134

g. *El apagado de la expresión de z-chimaerin no afecta el “patterning”*_____ 136

h. *Los embriones “knock-down” están “posteriorizados”*_____ 138

i. *La actividad de GAP de z-chimaerin es necesaria en la YSL para la regulación de epíboli*_____ 142

VII.3 Conclusiones_____ 148

VIII Conclusiones Finales

VIII.1 La familia de las β -chimaerins_____152

VIII.2 β 2-chimaerin como modelo de proteínas activadas por DAG_____153

VIII.3 β 2-chimaerin y su interacción con proteínas fosforiladas en tirosina_____154

VIII.4 Las SUPER-chimaerins y el nexa entre Rac y el segundo mensajero DAG_155

VIII.5 Evolución de las quimerinas en los vertebrados_____156

VIII.6 La función de las quimerinas en el desarrollo del pez cebra_____158

IX Bibliografía

_____160

X Abreviaturas y Anglicismos

_____172

XI Anexo

_____176

I- Introducción

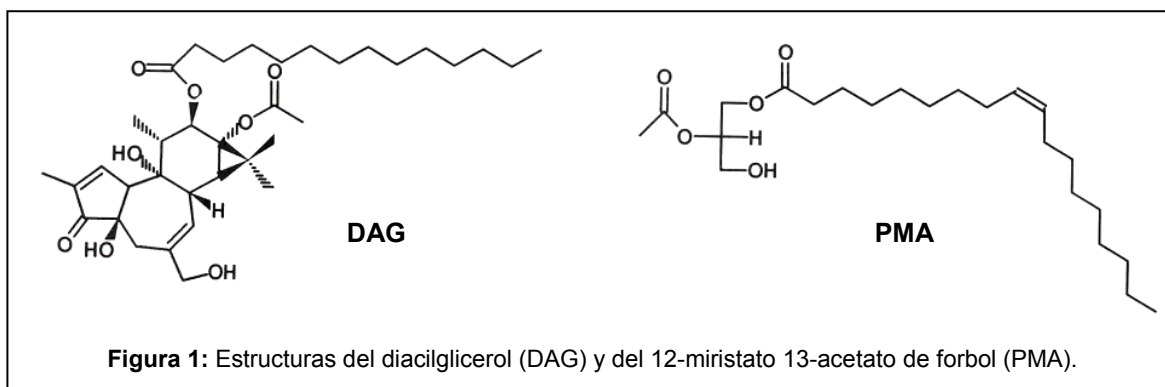
1.1 El DAG y sus receptores

a. El segundo mensajero diacilglicerol (DAG) y los ésteres de forbol

El DAG es un lípido de membrana producido a partir de un producto de fosforilación del fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂). El PI y sus derivados son fosfolípidos ácidos que representan una pequeña porción de los fosfolípidos de membrana. La cabeza del fosfolípido contiene D-myo-inositol. Este grupo puede estar fosforilado en numerosas posiciones por las fosfatidilinositol quinasas. La hidrólisis del PIP₂ por acción de las fosfolipasas genera inositol trifosfato (IP₃) y DAG. El IP₃ difunde al citoplasma, uniéndose a receptores específicos en el retículo endoplasmático, gatillando la liberación de otro segundo mensajero, el calcio (Ca⁺⁺). El DAG generado queda en la membrana donde recluta proteínas con dominios ricos en cisteínas (dominios C1) como las proteínas de la familia de la proteína quinasa C (PKCs). La elevación de los niveles de DAG por estimulación de receptores acoplados a fosfolipasas es rápida y transitoria, y puede ser seguida por una segunda fase o aumento prolongado de DAG. Este fenómeno se debe a la producción de DAG por dos fuentes diferentes. La primera es mediante la activación de receptores de membrana acoplados a proteínas G heterotriméricas de la familia Gq o de receptores tirosina quinasa, que activan a la enzima fosfolipasa C (PLC) en respuesta a estímulos como factores de crecimiento, hormonas o neurotransmisores. La segunda fuente de DAG es responsable de la fase prolongada y se supone que está mediada por la fosfolipasa D. Esta enzima hidroliza fosfatidilcolina a ácido fosfatídico, quien por acción de fosfomonoesterasas puede convertirse en DAG. Adicionalmente, la fosfolipasa D es activada por varias clases de receptores. El DAG se metaboliza rápidamente ya sea por acción de lipasas y esterasas, o convirtiéndose a ácido fosfatídico mediante la acción de DAG quinasas.

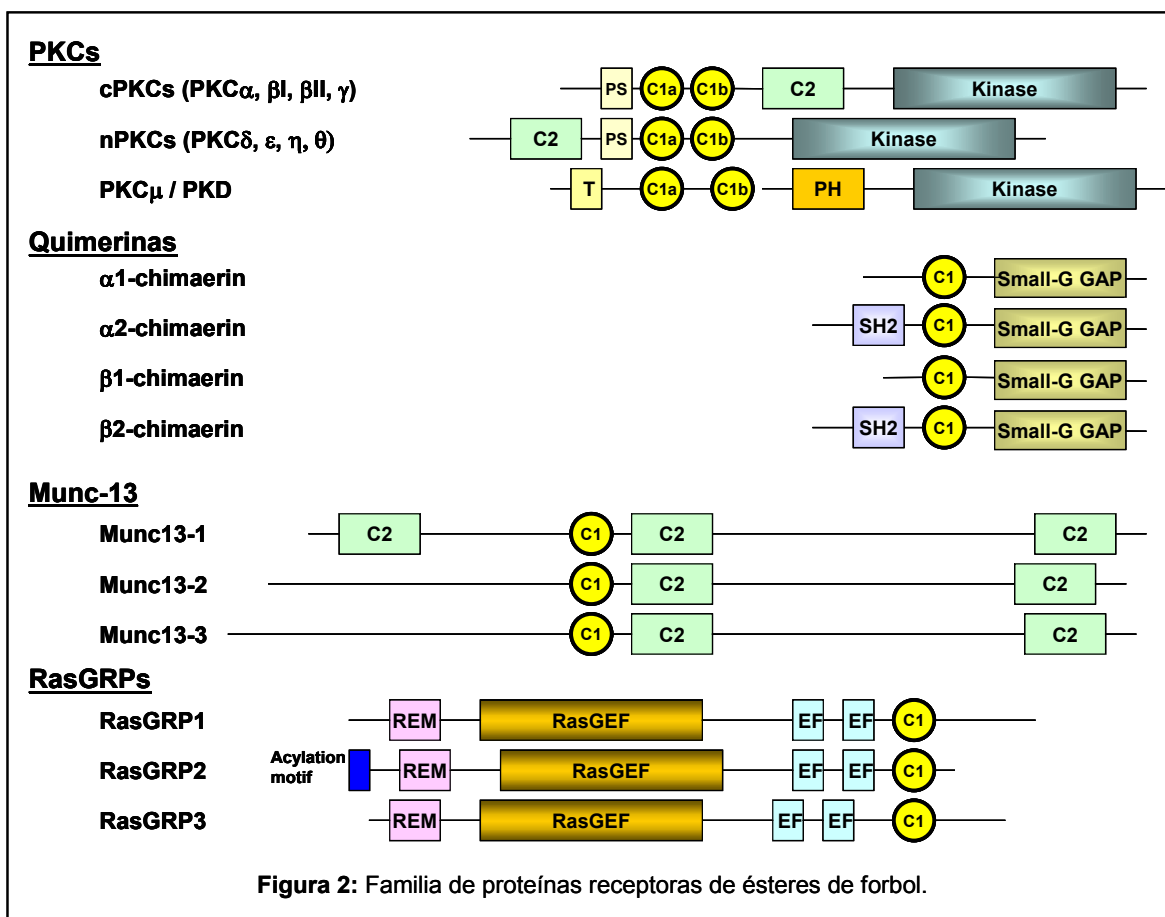
Los ésteres de forbol son productos naturales aislados de plantas de la familia *Euphorbiaceae* que despertaron mucho interés por su potencial como promotores tumorales en la piel. Estos compuestos, estéricamente similares al DAG, son ampliamente utilizados en el laboratorio como imitadores del DAG ya que son más estables y más potentes. El éster de forbol más utilizado en el laboratorio es el PMA (“*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*”) también conocido como TPA (“*Tetradecanoyl Phorbol Acetate*”). Experimentos de unión de

ligando utilizando un éster de forbol radioactivo ($[^3\text{H}]$ forbol 12-13 di-butirato o $[^3\text{H}]$ PDBu) revelaron que las PKCs unen estos compuestos en el rango de concentraciones nanomolar [1]. Como ejemplo podemos citar a $\text{PKC}\alpha$, con una constante de disociación (K_d) de aproximadamente 1 nM.



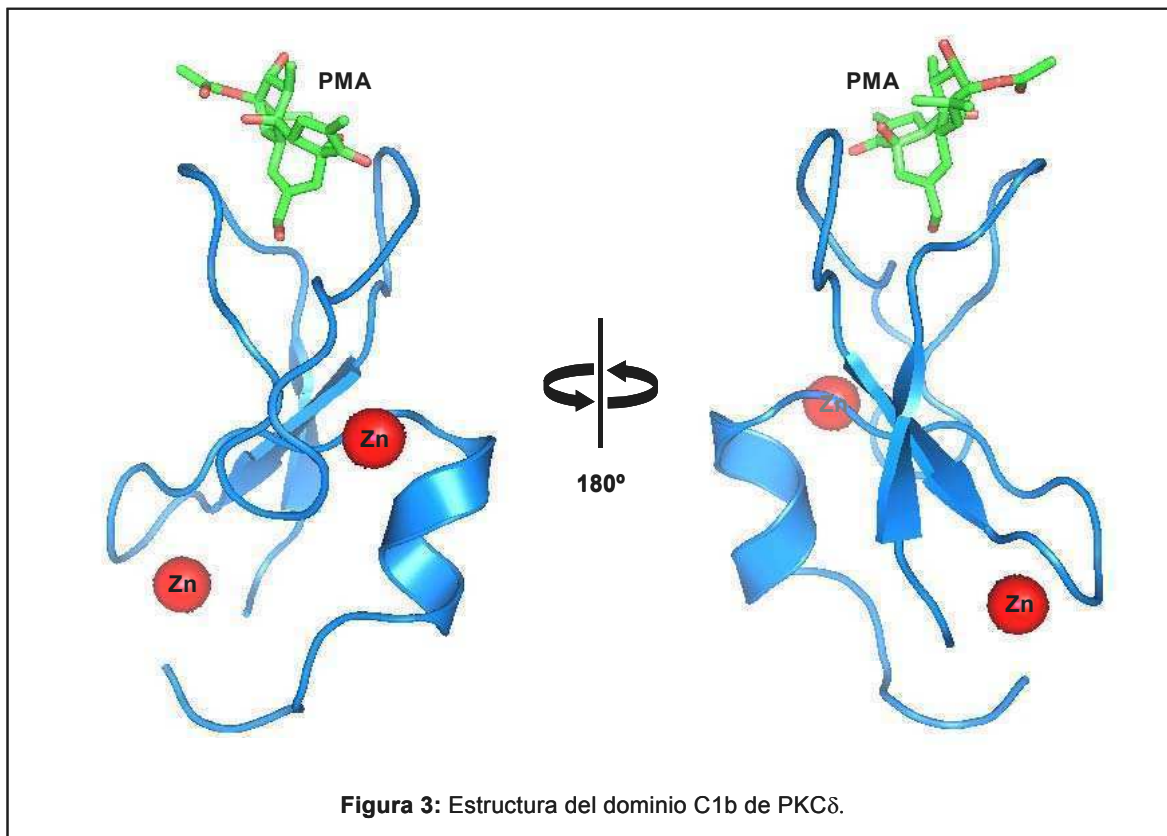
b. Moléculas receptoras de DAG y ésteres de forbol y los dominios “C1”

Clásicamente, las PKCs eran reconocidas como las únicas receptoras para el DAG y los ésteres de forbol. Todas las isoenzimas de PKC están compuestas por dos regiones fundamentales: una región regulatoria amino (N-) terminal y una región catalítica carboxilo (C-) terminal y contienen 4 dominios conservados (C1-C4) y 5 dominios variables (V1-V5) [2]. Mediante una serie de deleciones y mutaciones de PKC se estableció que el dominio C1 era el dominio mínimo necesario para la unión de DAG y ésteres de forbol [3]. Este dominio de 50 o 51 aminoácidos está duplicado en tandem en la región N-terminal de la región reguladora de las PKC. En los últimos años se identificaron tres nuevas familias de proteínas que contienen dominios C1 capaces de unir DAG y ésteres de forbol, pero no presentan actividad quinasa: las de proteínas de la familia de Unc-13; las Ras-GRPs; y las quimerinas o “chimaerins”, cuya función y regulación estudiaremos en esta tesis [4]. En la figura 2 se muestra la familia de proteínas receptoras de ésteres de forbol.



Los dominios C1 son ricos en cisteínas, y todos poseen la secuencia consenso $HX_{12}CX_2CX_{13/14}CX_2CX_4HX_2CX_7C$, donde H es histidina, C es cisteína, y X es cualquier otro aminoácido. Las dos histidinas y las cinco cisteínas coordinan dos iones zinc (Zn^{++}). Mutaciones en cualquiera de estas histidinas o cisteínas afectan la integridad de la estructura del dominio con la consecuente pérdida de la capacidad de unir DAG o ésteres de forbol [5]. La estructura del dominio C1b de PKC δ en complejo con ésteres de forbol fue resuelta por cristalografía de rayos X [6]. Este dominio consiste en dos pequeñas hojas plegadas β y un α hélice carboxilo terminal plegados de una forma compacta, acomplejando los iones de Zn^{++} . Los dos extremos de la hoja β N-terminal forman dos lazos que se encuentran levemente separados formando una cavidad. Los ésteres de forbol se insertan a lo largo dentro de este pequeño bolsillo en un extremo del dominio, formando una superficie hidrofóbica continua. La cadena acílica del éster de forbol está involucrada en la inserción

de este dominio a la membrana. Los residuos que se encuentran alrededor del sitio de unión, y que están posicionados hacia afuera son críticos para la interacción con lípidos y ligandos [7] (Figura 3). Se hipotetiza que la unión al ligando y la inserción en la membrana ocasiona un cambio conformacional a gran escala en las PKCs, que lleva a su activación alostérica y a la estimulación de su actividad quinasa [8, 9].



En las bases de datos se encuentra una enorme cantidad de secuencias de proteínas con dominios C1, que en su gran mayoría carecen de las características típicas para el reconocimiento de DAG y ésteres de forbol. Un ejemplo de esto último son las PKC atípicas, como PKC ζ , la proteína Raf-1 o la proteína oncogénica Vav, que fue confundida con un receptor de DAG en ciertas publicaciones. Si bien se ha encontrado una topología similar entre dominios C1 sensibles e insensibles a DAG, residuos críticos para la unión no están presentes en estos últimos. El dominio C1 de Raf-1 no presenta uno de los lazos entre los brazos de una de las hojas β , ni tampoco se reconocen residuos hidrofóbicos esenciales.

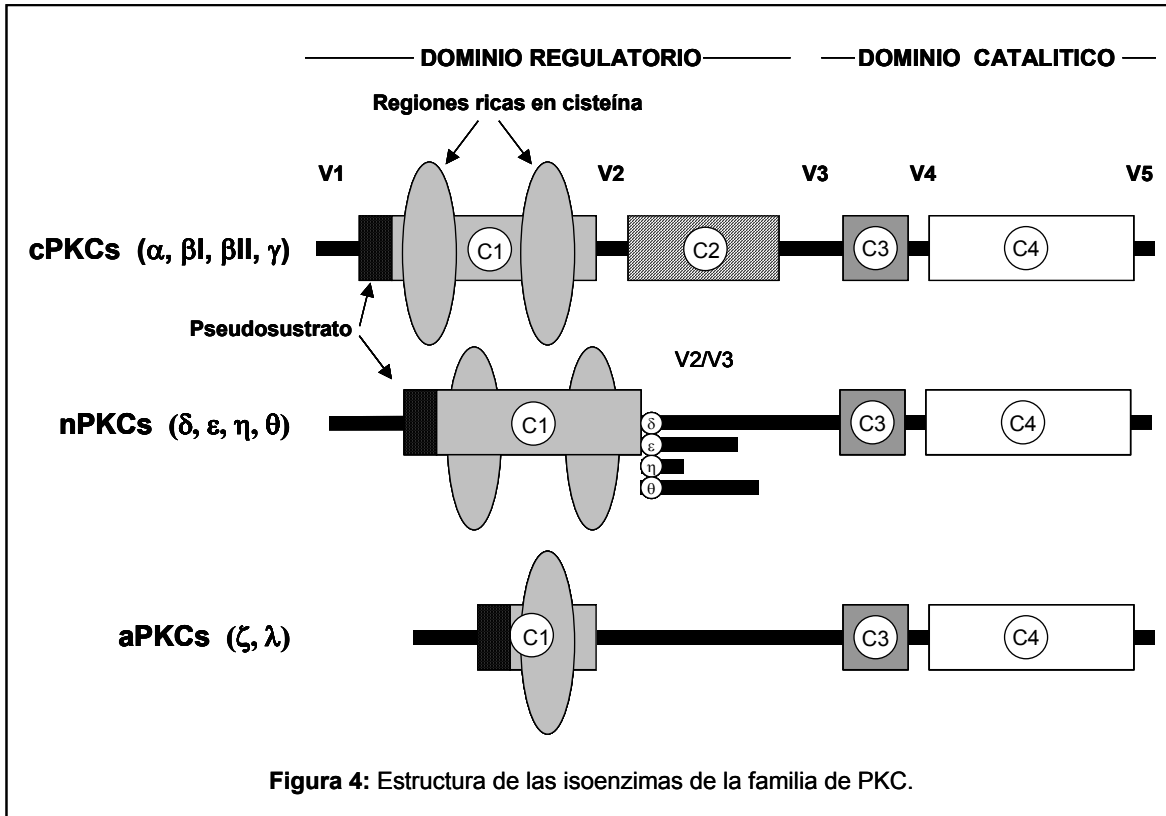
Sin embargo, el dominio C1 de Raf-1 es capaz de unir fosfolípidos y está involucrado en interacciones proteína-proteína [10]. Esto sugiere que los dominios C1 insensibles a ésteres de forbol pueden estar involucrados en asociaciones con lípidos y/o otras proteínas.

c. La proteína quinasa C (PKC)

La proteína quinasa C fue identificada y caracterizada inicialmente como una quinasa activada por proteólisis que fosforilaba residuos de serina. Más adelante se descubrió que la actividad quinasa de PKC era dependiente de Ca^{++} y activada por DAG, y que era el principal receptor intracelular para los ésteres de forbol con actividad promotora tumoral. Existen 10 isoformas diferentes clasificadas según su homología de secuencia y propiedades bioquímicas en tres subfamilias: PKCs clásicas o convencionales (“cPKC”), PKCs noveles (“nPKC”) y PKCs atípicas (“aPKC”).

Las PKCs contienen cuatro dominios constantes separados por dominios variables (Figura 4). La región regulatoria está formada por los dominios C1 y C2. El dominio C1 se encuentra duplicado en la mayoría de las isoenzimas, y es el responsable de la unión a DAG y ésteres de forbol. Este dominio está inmediatamente precedido por un pseudosustrato auto inhibitorio. El dominio C2 contiene los sitios de reconocimiento para lípidos ácidos, y a su vez, posee los sitios de unión a Ca^{++} . Sin embargo, en las nPKCs el dominio C2 no posee los grupos funcionales que determinan la unión a Ca^{++} [11] y no responden a regulación por éste. La región catalítica está formada por los dominios C3 y C4 que forman los sitios de unión a ATP y sustrato, respectivamente [12]. Todas las PKCs presentan una región V3 que une la región regulatoria a la región catalítica. Esta región presenta sitios de restricción para varias proteasas. En efecto, durante el proceso apoptótico en algunas células las PKCs pueden ser clivadas en esta región por caspasas liberando la región catalítica que es constitutivamente activa [13]. La función principal de la región regulatoria es mantener a la enzima en una conformación inactiva, y esto se lleva a cabo mediante la unión del pseudosustrato a la región catalítica [8]. El activador de PKC, ya sea DAG o ésteres de forbol, al unirse al dominio C1 desplaza al pseudosustrato, revirtiendo de esta forma la inhibición, y estimulando la actividad quinasa presente en la región catalítica. En la mayoría de los casos,

la activación de PKC requiere también de la asociación a membranas celulares o al citoesqueleto.



Las PKCs se dividen en tres grupos. El grupo de las PKC clásicas (cPKCs) comprende las siguientes isoenzimas activadas tanto por aumentos en las concentraciones intracelulares de Ca^{++} como por incrementos en los niveles del segundo mensajero DAG. El segundo grupo, denominado PKC noveles (nPKC), comprende a las isoenzimas que responden al DAG pero son insensibles a la regulación por Ca^{++} . Por último, se encuentra el grupo de las PKCs atípicas (aPKCs), las cuales son insensibles al Ca^{++} y al DAG, y generalmente son reguladas por mecanismos de transfosforilación [14, 15]. Algunas isoenzimas son expresadas en casi todos los tipos celulares, como PKC α y PKC ζ , mientras que otras tienen un patrón de expresión mucho más definido, como es el caso de PKC γ y PKC η .

La familia de PKC puede ser activada por una amplia gama de estímulos, como factores de crecimiento, neurotransmisores y hormonas, a través del segundo mensajero DAG. Tanto el DAG como los ésteres de forbol actúan como anclas hidrofóbicas que reclutan a PKC hacia la membrana celular, aumentando considerablemente su afinidad por la misma [12]. Las diferencias que existen en los efectos biológicos de estos dos ligandos pueden ser explicadas por una potencia dos órdenes de magnitud mayor para los ésteres de forbol con respecto al DAG [16], y por una mayor estabilidad de los primeros dentro de las células.

La unión de los ésteres de forbol a las isoenzimas de PKC clásicas y noveles determina la activación de estas enzimas y la asociación de las mismas a la membrana celular, evento conocido como “translocación” de PKC [17]. El tratamiento prolongado con ésteres de forbol resulta, sin embargo, en la degradación de PKC. El tiempo necesario para que se produzca esta degradación tras el tratamiento con ésteres de forbol varía considerablemente entre los distintos tipos celulares, pudiendo ser de unas pocas horas a unos pocos días [12].

d. Unc-13, las isoformas de Munc-13 y Dunc-13

La familia de proteínas de Unc-13 incluye la isoforma de *Caenorhabditis elegans*, las isoformas de Munc-13 de mamíferos y el homólogo de *Drosophila melanogaster* Dunc-13. Unc-13 es una proteína de 1734 aminoácidos que posee una región de similitud de secuencia con el dominio regulatorio de PKCs y fue identificada en una búsqueda de genes que afectan la coordinación del movimiento en *C. elegans* [18]. La región central de Unc-13 posee un solo dominio C1, un dominio C2 inmediatamente 5' y un segundo dominio C2 en el extremo carboxilo terminal. Como en la nPKCs, los dominios C2 no unen Ca^{++} y están involucrados en el reconocimiento de fosfolípidos. La unión de ésteres de forbol de esta proteína es dependiente de fosfolípidos [19]. Estudios de unión a ligando (“*Scatchard Plot*”) utilizando como radioligando el éster de forbol [3H]PDBu revelaron que el dominio C1 de Unc-13 expresado en *Escherichia coli* tiene una afinidad en el rango bajo nanomolar ($K_d = 1.3$ nM), mostrando sólo ligeras diferencias en el reconocimiento de ligando en comparación con el dominio C1b de PKC δ [19]. El tratamiento con PMA causa la translocación a la

membrana plasmática de las tres isoformas de Munc13 cuando se las sobrepresa en células HEK-293 fusionadas a GFP (*Green Fluorescent Protein*). Esta translocación es dependiente del dominio C1, ya que mutantes insensibles a ésteres de forbol no se translocan. Por otra parte, mutantes truncadas de Munc13 mostraron que el dominio C1 es necesario y suficiente para causar la translocación [20].

Las isoformas de Munc13 actúan como proteínas adaptadoras que interactúan con proteínas de la maquinaria exocítica como syntaxin, Doc2, Rim1 y spectrin [21-24], y por lo tanto están involucradas en exocitosis. Munc13-1 actúa transfiriendo vesículas inactivadas (*unprimed*) hacia vesículas activas (*primed*) listas para ser exocitadas.

e. RasGRPs

RasGRPs son una familia de factores intercambiadores de nucleótidos de guanidina (GEFs). Los GEFs son proteínas que catalizan el intercambio de GTP por GDP en las pequeñas proteínas que unen GTP. RasGRP1 fue identificada utilizando un ensayo de transformación de fibroblastos en busca de proteínas que pudiesen complementar células deficientes a la transformación por Ras [25]. Estas proteínas están expresadas en cerebro y timo, además de medula ósea, riñón y bazo [25-28]. El análisis de secuencia revela un solo dominio C1 localizado en la región carboxilo terminal (Figura 2). RasGRP1 presenta además un dominio atípico con un par de “manos EF” (*EF hands*) que unen Ca^{++} , un dominio rico en prolinas, y los dominios responsable de su actividad intercambiadora de GTP sobre Ras, un dominio Cdc25 homólogo al de Sos, y un dominio REM (*Ras Exchange Motif*) [25, 27].

RasGRP1 une [3H]PDBu con una afinidad de 0.6 nM en presencia de vesículas de fosfatidilserina. Del análisis de la estructura se observan sólo diferencias menores en el reconocimiento del ligando en comparación con las PKCs. Sin embargo, RasGRP1 tiene una dependencia distinta a cofactores lipídicos [29], el dominio C1 y las “manos EF” son menos dependientes que las PKCs a los fosfolípidos ácidos. A pesar de la presencia de las manos EF atípicas, la unión de ésteres de forbol no es afectada por Ca^{++} .

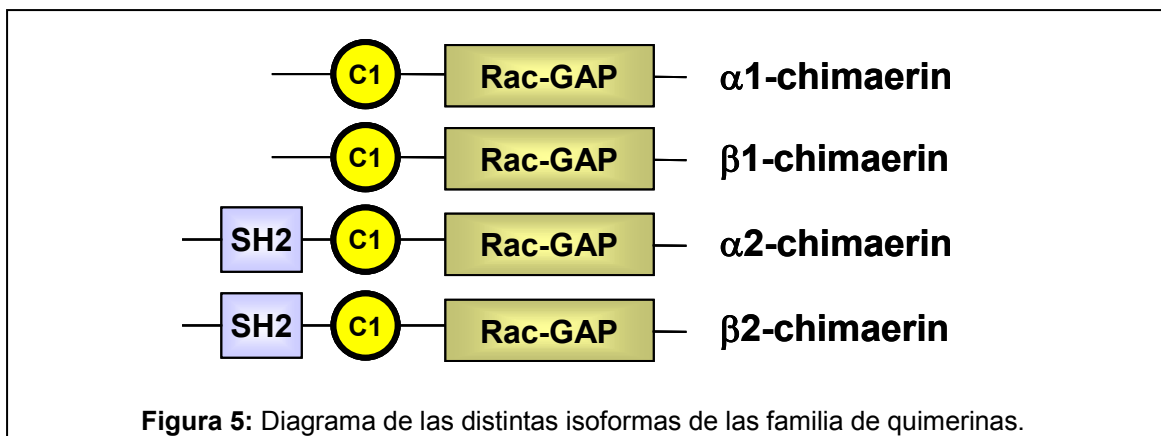
La activación de Ras por ésteres de forbol ha sido estudiada durante años. Existen múltiples puntos de conexión entre las cascadas de transducción de señales de las PKCs y

las de Ras, tanto por encima como por debajo de Ras [30-33]. El descubrimiento de RasGRP1 reveló una nueva conexión entre la señalización a través de DAG mediada por receptores y la activación de Ras, de forma independiente a la activación de PKC. La expresión de RasGRP1 aumenta los niveles de Ras GTP y este efecto es potenciado por el tratamiento con PMA [25, 27]. Esta potenciación no es bloqueada por inhibidores de PKC, lo que confirma que la activación de Ras por RasGRP1 es independiente de PKC [34]. El reclutamiento de RasGRP1 a la membrana es suficiente para causar la activación de Ras. La forma prenilada de RasGRP1 es suficiente para activar, en forma dependiente de Ras, a ERK, una proteína de la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [27]. Una forma mutada de RasGRP que no une ésteres de forbol es incapaz de activar la cascada de señalización que lleva a la activación de ERK. Por lo tanto la unión de DAG cumple un papel dominante en la activación de RasGRP1. La regulación de RasGRP2 por ésteres de forbol es incierta ya que es un GEF para Ras y para Rap1 que se encuentra localizada en la membrana plasmática por medio de modificaciones post-transduccionales (palmitoilación y miristoilación). Tras el tratamiento con PMA en células COS-1, RasGRP2 no redistribuye a pesar de la presencia del dominio C1, aunque la actividad de Rap1/Ras GEF se ve potenciada por el éster de forbol [35].

f. Quimerinas o "chimaerins"

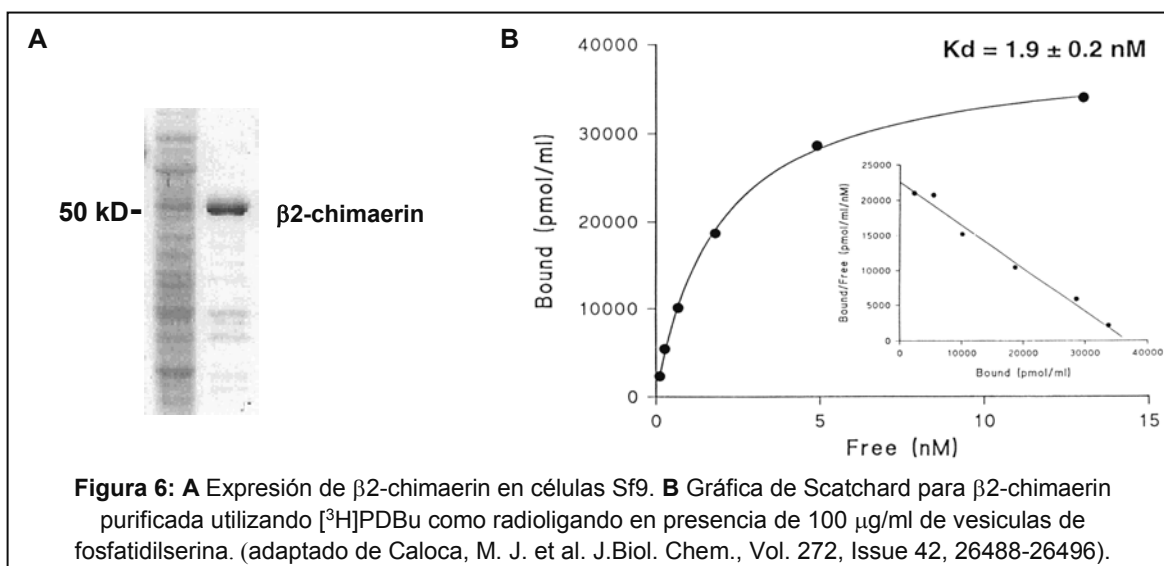
Esta familia de receptores de ésteres de forbol es una "quimera" entre la región reguladora de las PKCs y el BCR (*Breackpoint Cluster Region*), una proteína involucrada en la translocación del cromosoma de Filadelfia en leucemia mielógena crónica. n-chimaerin (posteriormente llamada α 1-chimaerin) fue aislada como una proteína de 34 kD de cerebro [36]. Posteriormente tres nuevas isoformas fueron descritas, α 2, β 1 y β 2-chimaerin. Todas ellas poseen un dominio C1 homólogo al de las PKCs y un dominio Rho-GAP (*GTPase Activating Protein*). Estas proteínas son codificadas por dos genes α y β , los cuales se cree que por procesamiento diferencial o "splicing alternativo" generan las isoformas 1 y 2. Dado que el splicing ocurriría 5' del dominio C1, los productos de cada gen poseen idénticos dominios C1 y GAP [37]. Los dominios C1 y GAP productos de cada gen poseen un 94 % de identidad de secuencia. La región N-terminal presenta diferencias entre las isoformas 1 y

2. Las isoformas 1 poseen una región inicial corta y de función aún desconocida, mientras que las isoformas 2 presentan un dominio SH2 (Figura 5). En el primer capítulo de esta tesis se muestra que el gen de β -chimaerin codifica para más de dos isoformas, mediante mecanismos distintos al “*splicing* alternativo”.

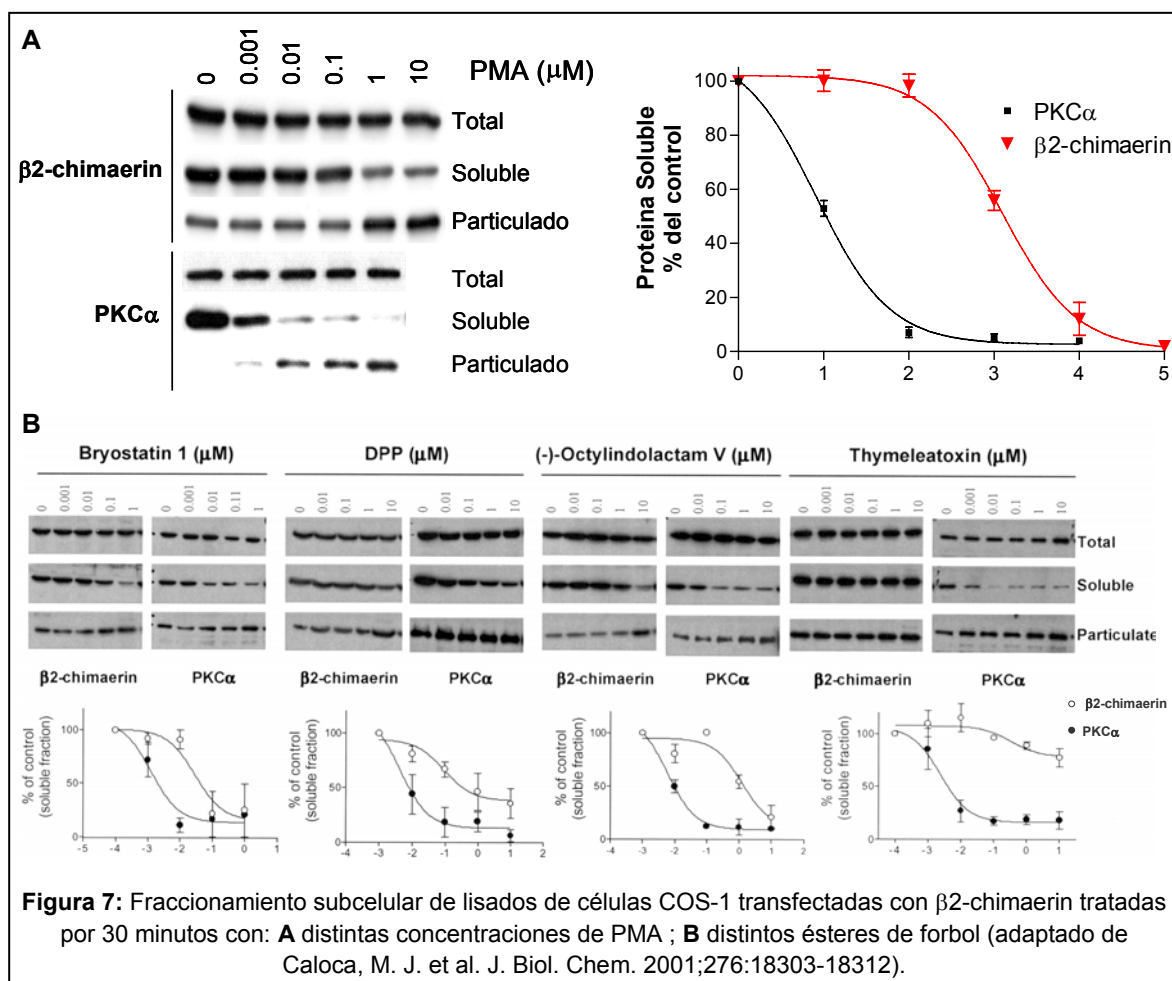


g. El dominio C1 en las quimerinas

Ensayos de unión de ligando *in vitro* del tipo “*Scatchard plot*” utilizando [3 H]PDBu revelaron que β 2-chimaerin recombinante une ésteres de forbol con alta afinidad en presencia de vesículas de fosfatidilserina. La K_d es aproximadamente 1 nM [38], similar a las de las cPKCs y nPKCs para este radioligando [1] (Figura 6). Algunas diferencias interesantes entre β 2-chimaerin y las PKCs fueron observadas al estudiar la afinidad por diferentes ésteres de forbol. Así, el análogo del promotor tumoral mezereina, la thymeleatoxina, presenta una afinidad por PKC α 60 veces mayor que para β 2-chimaerin [38] (Figura 7B). Adicionalmente, distintos análogos del DAG muestran una ligera preferencia por β 2-chimaerin con relación a PKC α [39]. Esto indica que distintos dominios C1 presentan distintas preferencias de ligando, debido a interacciones del ligando con residuos específicos. Por otra parte, las diferentes dependencias de co-factores como Ca $^{++}$ y/o lípidos confieren distintas propiedades a los diferentes receptores de ésteres de forbol, probablemente como una forma de conferirle especificidad en su respuesta y actividad.



En ensayos *in vivo*, utilizando fraccionamiento subcelular en células COS-1, se observa la mayor diferencia en la respuesta a ésteres de forbol entre β 2-chimaerin y las PKCs tanto en la cinética como en la dosis. Ambas proteínas responden al tratamiento con PMA translocándose de la fracción soluble a la insoluble. β 2-chimaerin requiere de una concentración de PMA 100 veces mayor para translocarse que la requerida por las PKCs [40, 41] (Figura 7A). Esta menor asociación a membrana se creyó que era debido a la ausencia de algunos residuos aminoacídicos esenciales en la estructura del dominio C1 de las quimerinas. La translocación de β 2-chimaerin por ésteres de forbol es independiente de PKC ya que ocurre aún en presencia de inhibidores de PKC y requiere del dominio C1, dado que mutaciones o deleciones en este dominio abolen la translocación [39]. Este resultado refuerza la idea de que un solo dominio C1 es suficiente para la translocación, según se reportó para los dominios C1 aislados de distintas PKC [42].

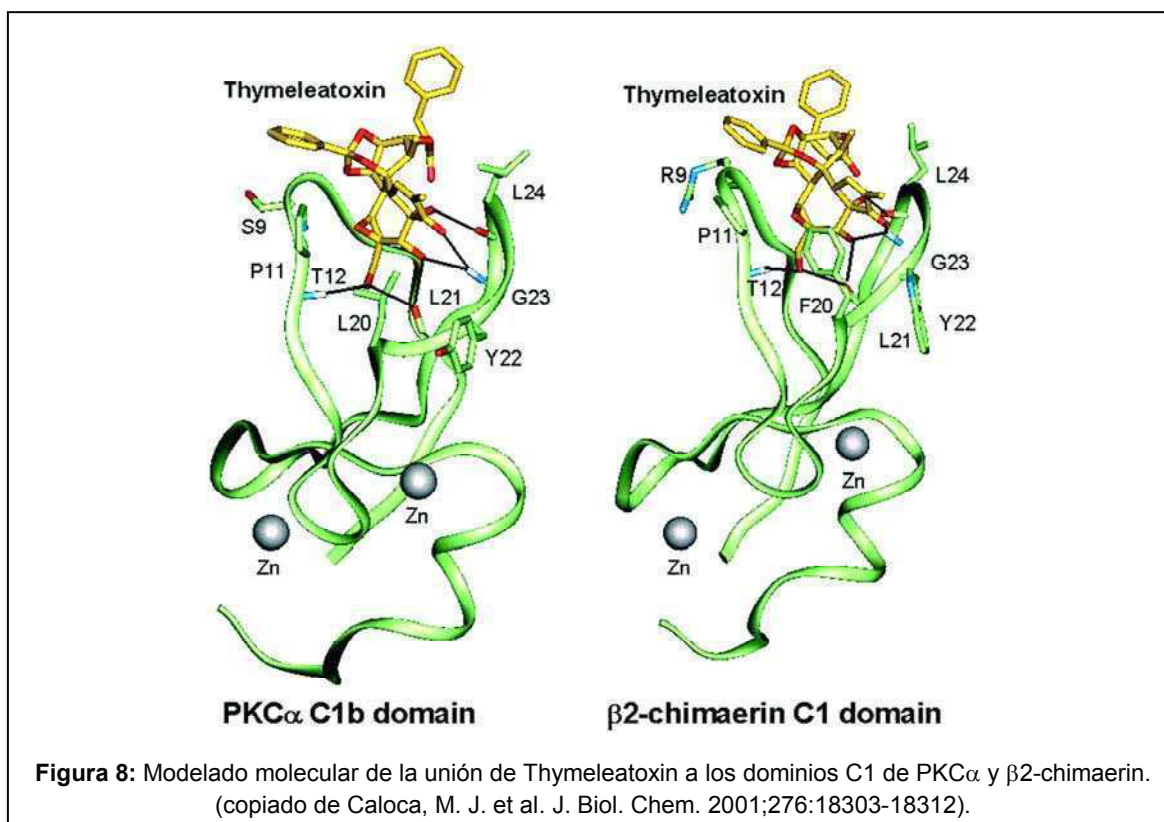


La proteína de fusión GFP- $\beta 2$ -chimaerin se aloja en el citoplasma de células COS-1 en ausencia de estímulo. Luego de estimularlas con PMA se transloca a la membrana plasmática y al espacio perinuclear/Golgi, según revela la co-localización con marcadores específicos del aparato de Golgi [40, 43].

El dominio C1 de $\beta 2$ -chimaerin también está involucrado en interacciones proteína-proteína. La proteína Tmp21-I, un miembro de la familia de proteínas transmembrana de p24 involucrada en el tráfico de vesículas secretorias, interactúa con el dominio C1 de $\beta 2$ -chimaerin [43]. Esta proteína funcionaría anclando a $\beta 2$ -chimaerin al aparato de Golgi, en analogía con las PKCs, donde la asociación con otras proteínas juega un papel importante en la localización celular. Aunque se conoce poco acerca de la regulación del funcionamiento del Golgi y del tráfico de vesículas por ésteres de forbol, se ha descrito previamente que el

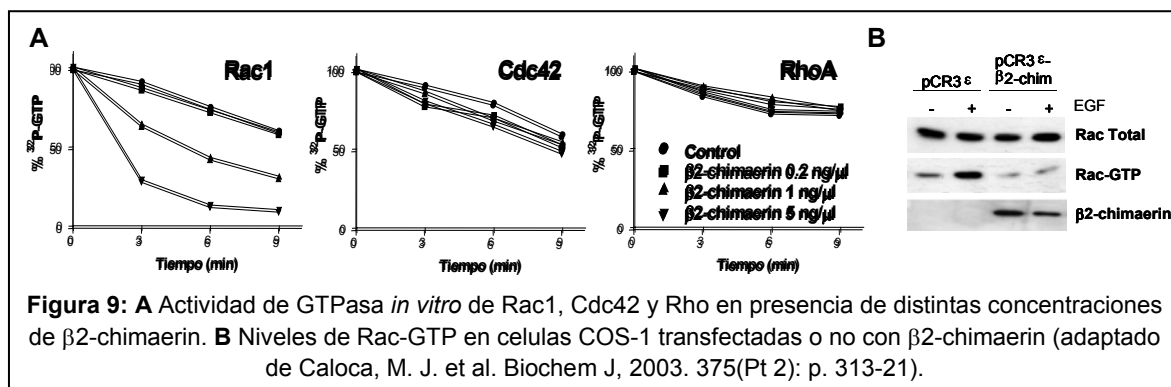
DAG está involucrado en el transporte vesicular desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática [44].

El modelado molecular del dominio C1 de $\beta 2$ -chimaerin utilizando como molde el dominio C1b de PKC α [6] revela que una arginina en posición 9 del dominio C1 de $\beta 2$ -chimaerin hace la superficie menos hidrofóbica y por lo tanto menos afín por insertarse en la membrana. Analizando el modelo de las estructuras se pueden ver las interacciones de puente de hidrógeno en el bolsillo hidrofóbico de los dominios C1 de $\beta 2$ -chimaerin y PKC α en la unión con la thymeleatoxina. Este compuesto, que se une pobremente a $\beta 2$ -chimaerin, no es capaz de redistribuirla, mientras que es un potente redistribuidor de PKC α . Esto se explica por la falta de algunas de las interacciones de puente de hidrógeno en la unión a $\beta 2$ -chimaerin (Figura 8) [40]. Estas diferencias en la estructura del dominio C1 se creían responsables de las diferencias de afinidad por DAG y ésteres de forbol. En el capítulo segundo de esta tesis se profundizará en la estructura del dominio C1 en el contexto de una proteína completa y su papel en la regulación de la actividad de $\beta 2$ -chimaerin.



h. El dominio de GAP en las quimerinas

La región C-terminal de $\beta 2$ -chimaerin presenta un dominio de GAP con homología a BCR[45]. Este dominio de GAP es específico para Rac, dado que es capaz de acelerar la hidrólisis del GTP a GDP por Rac sin afectar la actividad GTPasa de Cdc42 y Rho (Figura 9). Nos referiremos a este dominio como dominio de Rac-GAP [46].



La sobreexpresión de forma estable del dominio de GAP de $\beta 2$ -chimaerin en células de carcinoma mamario de ratón causa una reducción en la activación de Rac y en la remodelación del citoesqueleto de actina en respuesta al tratamiento con EGF. En estas células también ha observado una menor tasa de proliferación y migración *in vitro* cuando sobreexpresan el dominio β -GAP. Al inyectar estas células de forma subcutánea en ratones desnudos o “*nude*”, los clones que expresan el β -GAP forman tumores que crecen menos y son menos invasivos en comparación con células control [47].

Como se describirá más adelante, Rac es una proteína involucrada en distintos procesos celulares como remodelación del citoesqueleto de actina, migración, proliferación y control del ciclo celular [48, 49]. La sobreexpresión de $\alpha 1$ -chimaerin en fibroblastos de ratón NIH-3T3, altera el citoesqueleto y la adhesividad e impide el ensamblado de receptores de integrinas y la formación de focos de adhesión [50]. La expresión de $\alpha 1$ -chimaerin en leucocitos bloquea la fagocitosis, de la misma manera que se observa utilizando una mutante de Rac dominante negativa (Rac-N17) [51]. La identificación de $\beta 2$ -chimaerin asociada a la transformación maligna en astrocitomas, donde se ve una marcada reducción en los niveles de expresión de $\beta 2$ -chimaerin en comparación con tejido normal,

sugiere que la disminución de los niveles de expresión de quimerinas y la consecuente desregulación de la cascada de señalización de Rac son claves para el desarrollo y la progresión de gliomas malignos [52].

i. El dominio SH2 en las quimerinas

Los dominios SH2 (*por Src homology 2*) están formados por secuencias de aproximadamente 100 aminoácidos encontradas por primera vez como dominios sin actividad quinasa conservados en distintas familias de proteínas. Estos dominios son capaces de unir proteínas fosforiladas en tirosinas, y la especificidad para cada dominio particular está dada por la secuencia primaria de aminoácidos alrededor de la fosfo-tirosina [53].

Las quimerinas $\alpha 2$ -chimaerin y $\beta 2$ -chimaerin contienen en su estructura primaria un dominio SH2 que presenta una secuencia bien conservada con todos los residuos necesarios para su funcionalidad (Figura 5). Si bien no se han encontrado evidencias de que estos dominios unan proteínas fosforiladas en tirosina, se vio que en $\alpha 2$ -chimaerin el dominio SH2 cumple un papel fundamental en la neuritogénesis en células de neuroblastomas dado que mutantes de este dominio son incapaces de inducir la formación de neuritas [54]. Será uno de los objetivos de esta tesis identificar proteínas que interactúen con el dominio SH2 de $\beta 2$ -chimaerin.

I.2 Pequeñas proteínas G monoméricas

a. La superfamilia de Ras

Las proteínas G monoméricas forman una superfamilia con más de cien miembros identificados hasta la fecha en eucariotas, desde levaduras a humanos [55-57]. Estructuralmente los miembros de esta superfamilia se han clasificado en cinco familias, con diferentes implicaciones en la biología celular, y a su vez cada una estas familias se encuentra formada por diversas proteínas con diferentes funciones biológicas. (Figura 10)

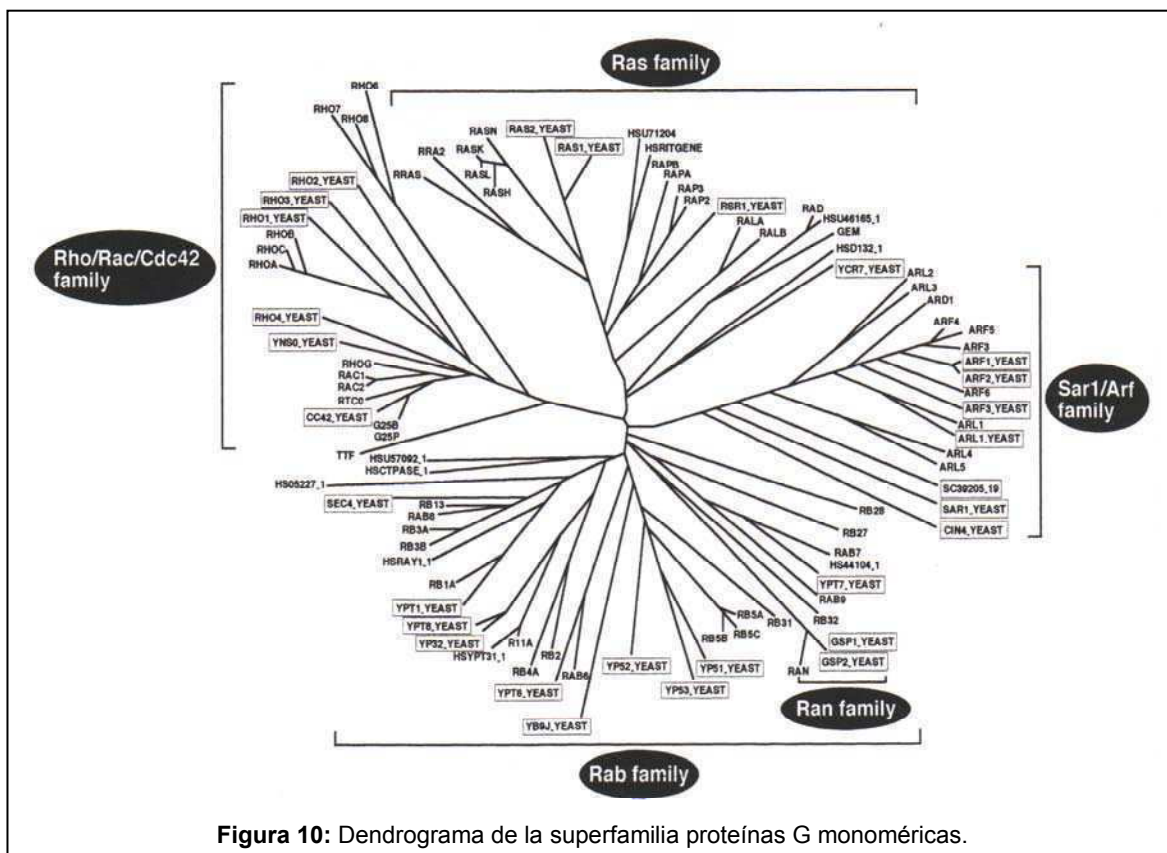
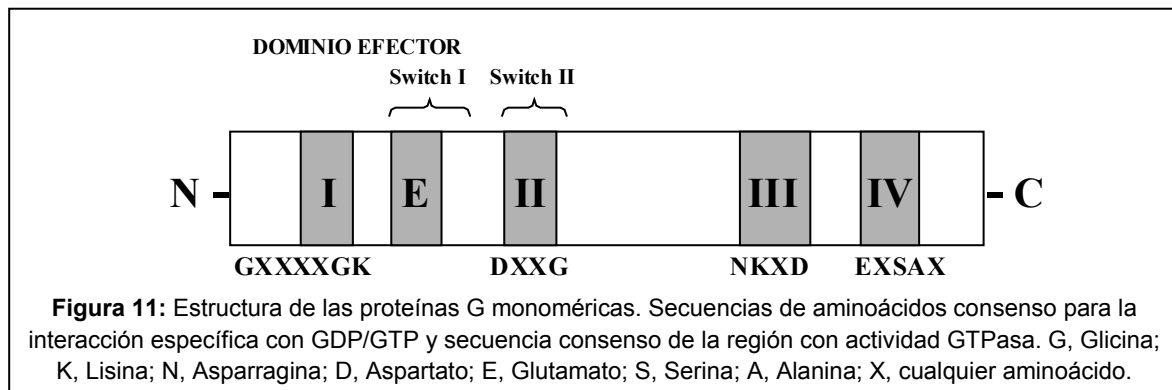


Figura 10: Dendrograma de la superfamilia proteínas G monoméricas.

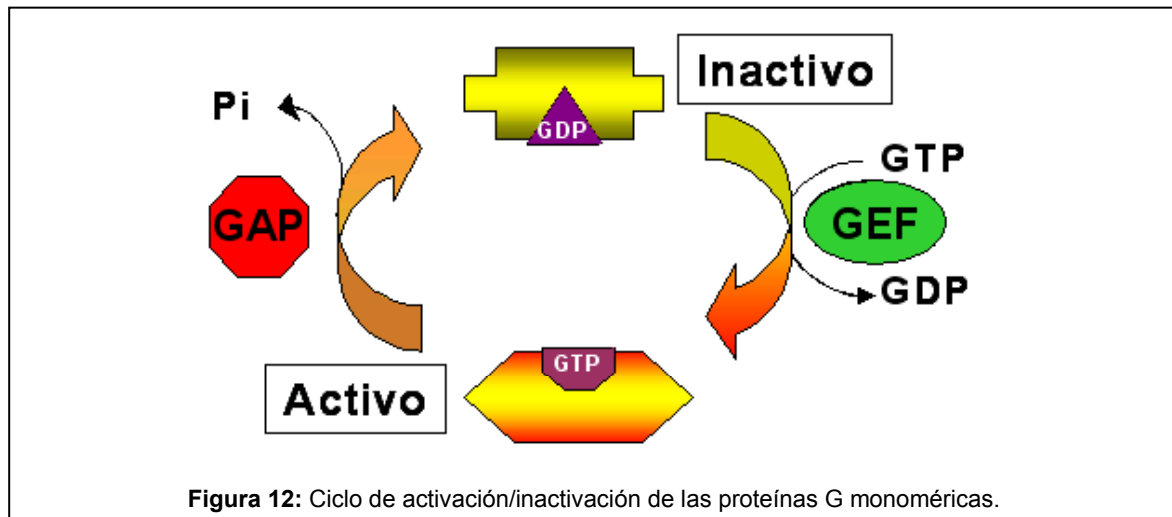
Las proteínas G monoméricas, con una masa molecular que varía entre 20 y 40 kDa, son GTPasas, es decir, enzimas capaces de unir e hidrolizar nucleótidos trifosfato de guanina o GTP. Estas proteínas se encuentran siempre unidas a nucleótidos de guanina y en función de la naturaleza de éste, las proteínas G se encontrarán en estado inactivo, cuando tienen unido GDP, o en estado activo, cuando tienen unido GTP [57].

Todas las proteínas G monoméricas poseen en su secuencia de aminoácidos una serie de regiones consenso (Figura 11) implicadas en la interacción específica con el GDP o el GTP, así como una región en la cual se localiza la actividad GTPasa [57-59]. Mediante el análisis cristalográfico de algunas de las proteínas G, se ha observado que el dominio de unión del GDP y GTP posee una topología común [60].



En la región C-terminal de estas proteínas, se producen una serie de modificaciones post-traduccionales. Más concretamente se trata de modificaciones lipídicas, que son necesarias para que se unan a membranas celulares, donde interaccionan con sus moléculas reguladoras y efectoras [57, 61-63].

Las proteínas G monoméricas se encuentran oscilando entre dos estados, uno inactivo cuando tienen unido GDP, y otro activado cuando unen GTP. El cambio de GDP a GTP se produce tras la recepción de una señal estimuladora, la cual provoca cambios estructurales que hacen accesible la región efectora a los denominados efectores. La forma activa de estas proteínas es capaz de hidrolizar el GTP gracias a su capacidad GTPasa intrínseca volviendo de nuevo a su estado inactivo y cerrándose de este modo el ciclo (Figura 12).



El paso limitante en el proceso de activación es el intercambio del GDP por GTP y esta reacción es extremadamente lenta, por lo que se hace necesaria la acción de un grupo de proteínas denominadas factores intercambiadores de nucleótidos de guanina o GEFs. Estos GEFs interaccionan con la forma inactiva de las proteínas G y facilitan la salida del GDP, el cual es rápidamente sustituido por GTP que se encuentra en exceso en la célula. La mayoría de las proteínas G monoméricas tienen GEFs específicos, como es el caso de Sos (Son of Sevenless) específico de Ras o Ral-GDS para Ral. Sin embargo, otros GEFs como Dbl, que activa a Rho/Rac/Cdc42 presenta un amplio espectro de sustratos.

La actividad GTPasa de las proteínas G es muy heterogénea, pero en general es bastante lenta, por lo que se hace necesaria la participación de otro grupo de proteínas denominadas factores activadores de la actividad GTPasa o GAPs cuya función es acelerar la hidrólisis del GTP. Al igual que ocurre con los GEFs, las proteínas activadoras de la capacidad GTPasa pueden ser muy específicas como es el caso de las quimerinas o presentar un amplio espectro de sustratos como p190GAP.

La mayoría de las proteínas G monoméricas, en general, se encuentran ampliamente distribuidas en células de mamíferos, aunque los niveles de expresión de los miembros de cada familia varían según el tipo celular y tan sólo algunos de los miembros de esta superfamilia presentan una expresión específica de tejido, como Rab17 en células epiteliales [64] o Rab3A en células secretoras como neuronas y células neuroendocrinas [64-68].

La localización subcelular de estas proteínas es variada, pudiendo encontrar en membrana plasmática, citosol o en núcleo, pero siempre unidas a un tipo específico de membrana.

b. La familia Rho

Las proteínas Rho pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras, y comparten cerca de 50 a 60% de identidad entre ellas y 30% de identidad con Ras. La principal diferencia de esta familia con Ras es que tienen una inserción de 13 aminoácidos (residuos 123-135 de Rac), llamada “*insert region*”. Atendiendo a las diferencias funcionales y en secuencia, la familia de GTPasas Rho en células de mamíferos puede ser dividida en cinco grupos:

- 1- RhoA, Rho B y RhoC.
- 2- Rac1, Rac2, y RhoG.
- 3- Cdc42 y TC10.
- 4- RhoD.
- 5- RhoE y TTF.

Al igual que Ras, la familia Rho es prenilada para su posterior ubicación en membrana (el lípido es geranyl-geranilo). Entre otras modificaciones post transduccionales, la proteína RhoA, es junto con las proteínas de la familia Rap las únicas pequeñas proteínas G que se fosforilan por PKA [69].

Las GTPasas de la familia Rho son modificadas por un gran número de toxinas y exoenzimas. La más estudiada ha sido la C3 transferasa, una exoenzima producida por *Clostridium botulinum* que ADP-ribosila Rho en el residuo asparragina 41, produciendo su inactivación [70]. Por otro lado las toxinas A y B de *Clostridium difficile*, glucosilan e inactivan Rho, Rac y Cdc42 [71]. Otras toxinas, como por ejemplo CNF-1 (*cytotoxic necrotizing factor-1*) de *Escherichia coli* deamidán el Gln63 de Rho (Gln 61 de Rac/Cdc42), transformándolo en Glu. La modificación de este residuo catalítico produce una versión constitutivamente activa de estas pequeñas proteínas G [72, 73].

La tasa de intercambio de nucleótido intrínseca de las proteínas Rho es muy lenta en concentraciones fisiológicas de magnesio [74]. Mutaciones que alteran la estabilidad del nucleótido (Como Phe 28 Leu en Cdc42, que coordina la base nitrogenada de guanina),

activan la proteína al entrar GTP, que se encuentra por exceso en la célula. El intercambio de nucleótidos se da con la ayuda de factores intercambiadores de GDP/GTP o GEFs. De forma similar a otros miembros de la familia Ras, las proteínas Rho funcionan como interruptores binarios, activos en su forma unida a GTP e inactivos en la forma unida a GDP. El ciclo entre el estado activo y el inactivo es regulado por factores intercambiadores de GTP/GDP (GEFs), proteínas estimuladoras de la actividad GTPasa (GAPs) e inhibidores de la disociación de los nucleótidos de guanina (GDIs) [75].

La función principal de las proteínas de esta familia es la reorganización del citoesqueleto de actina [76, 77], el cual está directamente implicado en cambios morfológicos, de movilidad celular, adhesión y citocinesis [78].

Algunas de las proteínas de esta familia también se encuentran implicadas en procesos de expresión génica, como es el caso de Rac y Cdc42 que son capaces de activar a JNK y p38 en algunos tipos celulares como NIH-3T3, HeLa o COS-1 [48, 79]. También se ha observado que Rho, Rac y Cdc42 son capaces de activar al Factor de Respuesta a Suero, SRF [80, 81], a NFκB [82, 83] y que son necesarias en la fase G1 del ciclo para la progresión de éste [84, 85]. Sin embargo su función precisa no está determinada, no estando claro si sus efectos se deben a una acción sobre el citoesqueleto de actina o directamente sobre la transcripción génica.

c. Factores intercambiadores de GDP/GTP o GEFs

En general los GEFs de la familia Rho poseen un dominio intercambiador característico, llamado DH (*Dbl homology*) y un dominio PH (*pleckstrin homology*) adyacente. Son referidos como la familia Dbl, luego de la identificación del primer intercambiador hallado (justamente llamado Dbl). Este poseía la capacidad de transformar células NIH-3T3 oncogénicamente [86]. El dominio DH es esencial para la transformación celular, y es el mínimo dominio capaz de intercambiar nucleótido sobre Rho y Cdc42 [87]. El dominio PH sería requerido para la correcta localización y orientación del dominio DH en la membrana plasmática [88-90], donde se encontrarían las proteínas G blanco.

La mayoría de los GEFs pertenecientes a la familia Dbl son capaces de intercambiar nucleótido sobre todas las GTPasas de la familia Rho *in vitro*, aunque parecería que *in vivo*

habría preferencias de GEFs sobre diferentes proteínas G. Dicha preferencia es evidenciada al sobreexpresar diferentes GEFs, que resultan en una distinta morfología celular. Dado que rearrreglos de la actina son mediados por la activación de diferentes proteínas G de la familia Rho, es posible evidenciar cual proteína G en particular es activada por un determinado GEF. La presencia de una mayor cantidad de GEFs que de GTPasas de la familia Rho, presenta una aparente contradicción, aunque este hecho tiene una explicación al encontrar que GEFs de la familia Dbl muestran distintos patrones de expresión (Tabla I). Por ejemplo Vav se expresa sólo en células hemopoyéticas. Tiam-1 se expresa en gran cantidad en cerebro, aunque se encuentra presente en todos los tejidos [91, 92]. También es posible que diferentes GEFs actúen ante diferentes estímulos extracelulares. Otra posibilidad es que cada GEF pueda ensamblar diferentes Rho GTPasas con un grupo de moléculas efectoras. Esta última posibilidad, podría explicar por qué diferentes GEFs activan PAK1, pero no JNK, aunque formas constitutivamente activas de Rac y Cdc42 pueden activar ambas quinasas [93]. Versiones oncogénicas de la familia Dbl de GEFs no poseen la región N-terminal [94], sugiriendo que esta región regula negativamente su función y que un cambio conformacional es requerido para su actividad.

Más recientemente, una nueva familia de GEFs para la familia Rho, que carecen del dominio DH-PH, ha sido descubierta. El miembro fundador de esta familia fue DOCK180, y aproximadamente diez nuevos miembros han sido descubiertos [95], [96]. DOCK180, necesita una proteína cofactor (ELMO) para intercambiar nucleótidos sobre Rac [97], pero otros miembros de esta familia parecerían no necesitar un cofactor [96].

Otro ejemplo de regulación es la relocalización: Tiam-1 migra desde el citoplasma a la membrana plasmática en respuesta a estimulación con factores de crecimiento, requeridos para la actividad de Rac [98].

Formas dominantes negativas de proteínas Rho (S17N en Rac y Cdc42 y S19N en Rho) han sido muy utilizadas para inhibir la activación de sus respectivas GTPasas, por competir con la unión de GEFs, y de esta manera analizar su función [99]. Asimismo, mutantes por delección de proteínas efectoras como PAK, son capaces de secuestrar formas activas de Rac y Cdc42, pero no de Rho [100], brindando una herramienta para evidenciar la activación diferencial de distintas proteínas G.

Tabla I: GEFs de las Rho-GTPasas en mamíferos

GEF	Especificidad	Propiedades biológicas	Distribución en tejidos
Dbl	Cdc42, Rho	oncogénico	cerebro, glándulas adrenales, gónadas
Lbc	Rho	oncogénico	corazón, pulmón, músculo esquelético
Lfc	Rho	oncogénico	células hematopoyéticas, riñón, pulmón
Lsc	Rho	oncogénico	células hematopoyéticas, riñón, pulmón
Tiam1	Rac	metastático y oncogénico	cerebro, testículo
Vav	Rac, Cdc42, Rho	oncogénico	células hematopoyéticas
Fgd1	Cdc42	implicado en la displasia faciogenital	cerebro, corazón, pulmón, riñón
Trio	Rac, Rho	migración celular?	ubícuo
Ost	Rho, Cdc42	oncogénico	cerebro, corazón, pulmón, hígado
Bcr	Rac, Cdc42, Rho	implicado en leucemia	predominantemente en cerebro
Abr	Rac, Cdc42, Rho	?	predominantemente en cerebro
SmgGDS	Rho, Rac	?	ubícuo

d. Proteínas que activan la actividad GTPasa o GAPs

Al igual que las proteínas G de la familia Ras, la familia Rho presenta una baja actividad de hidrólisis de GTP. Las proteínas GAPs incrementan la tasa de hidrólisis de GTP. Proteínas GAP de la familia Rho comparten un dominio de 140 aminoácidos llamado “*RhoGAP domain*”. Este dominio es el mínimo necesario que presenta actividad GAP. p50Rho-GAP es el prototipo de proteína GAP para la subfamilia de proteínas Rho. Se purificó utilizando Rho recombinante y se demostró que tenía actividad de GAP para Rho, Rac y Cdc42 *in vitro* [101]. Desde entonces se han identificado numerosos GAPs para las Rho GTPasas (Tabla II). Algunas de estas proteínas tienen actividad selectiva para Rho, Rac o Cdc42, mientras que otras son más promiscuas. Además del dominio de GAP, estas proteínas tienen otros dominios funcionales, lo cual indica que podrían tener funciones adicionales. La mayoría de estos dominios adicionales corresponden a secuencias localizadoras. Un ejemplo de esto es β 2-chimaerin, que posee además del dominio de GAP, un dominio SH2 y un dominio C1 [38].

Tabla II. GAPs de las Rho-GTPasas en mamíferos

GAPs	Especificidad	Distribución en tejidos
p50 Rho-GAP	Cdc42 > Rac, Rho	ubícua
Bcr	Rac > Cdc42	predominantemente cerebro
Abr	Rac, Cdc42	predominantemente cerebro
α 1-chimaerin	Rac	cerebro
α 2-chimaerin	Rac	cerebro, testículo
β 1-chimaerin	Rac	testículo
β 2-chimaerin	Rac	ubícua, abundante en cerebro y páncreas
p190GAP	Rho > Rac, Cdc42	ubícua
3BP-1	Rac, Cdc42	bazo, riñón, pulmón, cerebro, corazón
Myr5	Rho > Cdc42	ubícua
RalBP1/RLIP76/RIP1	Cdc42 > Rac	ubícua
Graf	Rho, Cdc42	ubícua, abundante en hígado y cerebro

e. Inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina o GDIs

Las proteínas Rho preniladas son mantenidas en un estado GDP inactivo en el citoplasma unidas a proteínas GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) hasta que un estímulo produce la disociación del complejo y la unión de Rho a la membrana [102]. *In vitro*, la unión a proteínas GDI previene el intercambio de nucleótidos, impidiendo su activación. La unión de GDIs inhibe también la actividad GTP intrínseca, impidiendo su desactivación.

La sobreexpresión de proteínas GDI generalmente inhibe la señalización por proteínas Rho, incluyendo la reorganización de la actina y la activación de JNK [102, 103], consistentemente con la idea de ser proteínas regulatorias negativas de la señalización de proteínas Rho. No se conoce un análogo de GDI para otras pequeñas proteínas G.

Además de la prenilación de Rho para ser reconocida por proteínas GDI, otras regiones serían necesarias. La “*insert region*” de Cdc42 no es necesaria para la unión de

GDI, pero es necesaria para la inhibición de la disociación del GDP y para la hidrólisis de GTP [104], sugiriendo que esta región, no presente en proteínas de la familia Ras, podría interactuar con RhoGDI.

Las proteínas GDIs no sólo mantienen inactivas en el citoplasma a las proteínas de la familia de Rho, sino que también regulan la translocación de las pequeñas proteínas que unen GTP a la membrana plasmática

f. Señalización por proteínas de la familia de Rho

El ácido lisofosfatídico (LPA) fue establecido como un activador de Rho, e independientemente bombesina demostró ser un activador de Rho y Rac. Factores de crecimiento, como PDGF, EGF e insulina estimulan Rac, llevando subsecuentemente a la activación de Rho, y agonistas de PKC, como PMA, fueron descritos como capaces de activar a Rac, sin activar Rho. LPA activa receptores acoplados a proteína G (GPCR), de la familia $G_{\alpha 12/13}$. Estas subunidades G_{α} se unen al dominio RGS de Rho GEFs, llevándolos a la membrana y activándolos [105, 106]. Rho GEFs que contienen un dominio RGS son p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF y LARG, y todos son capaces de ser activados por proteínas G heterotriméricas [107]. PMA estimula PKC y PKC activada es capaz de aumentar el intercambio sobre Rac mediado por Tiam-1 [108]. PMA no es capaz de activar Rho, de hecho, PKC es capaz de activar p190RhoGAP (una proteína GAP de Rho) a través de la actividad de c-Src [109]. El PMA activa también a las quimerinas y esto lleva a la inactivación de Rac [46], lo que indicaría que distintos estímulos regulan diferencialmente a diferentes miembros de la familia Rho.

Diversos GEFs de Rac son activados por PIP_2 o PIP_3 [108, 110]. Por ejemplo, la unión de PIP_3 al dominio PH de Tiam-1 es capaz de reclutarlo a membrana y activarlo. Otro mecanismo involucra la activación de un complejo que contiene Sos1, Eps8 y Abi1/E3B1 [111, 112], y forma un complejo con actividad GEF de Rac. Este complejo se localiza en la membrana al unirse a la subunidad regulatoria de PI_3K p85 [113]. La activación de Tiam-1 independiente de PI_3K también ha sido descrita. Tiam-1 posee un sitio de unión a Ras-GTP, al igual que Raf. Ras-GTP incrementa la actividad GEF para Rac de Tiam-1 al unirse a dicho dominio [114]. La estimulación de PDGF en fibroblastos Swiss 3T3 provoca una

activación de Tiam-1 dependiente de fosfolipasa C y proteína quinasa dependiente de Ca^{++} /calmodulina, que fosforila en treonina a Tiam-1, localizándola en la membrana y activándola [108].

Se han reportado diversas clases de moléculas de adhesión que afectan la actividad de Rho, Rac o Cdc42, incluyendo integrinas [115], caderinas [116] y miembros de la superfamilia de Ig [117].

Al formar uniones célula-célula las caderinas son capaces de activar a Rac y Cdc42. La activación de estas proteínas G ayudaría a las funciones de caderinas, mostrando un *feedback* positivo. Por otro lado, este compromiso entre caderinas sería inhibitorio de la función de Rho, al incrementar la actividad de p190RhoGAP [118].

g. Las proteínas de la familia de Rho reorganizan el citoesqueleto

El ensamblaje de la actina del citoesqueleto está regulado a múltiples niveles, incluida la organización monomérica de la actina dentro del polímero y la superorganización de los polímeros de actina en una red de filamentos. Un gran número de proteínas de unión a la actina regula el ensamblaje y controla la formación de los filamentos y el entrecruzamiento de la red de actina. Las funciones de estas proteínas son moduladas por moléculas señalizadoras como el Ca^{++} o los fosfoinosítidos fosforilados. [119, 120].

Se han acumulado muchas evidencias de que tanto en células de mamíferos como en levaduras, las GTPasas de la familia Rho son los reguladores de las vías de señalización que unen los estímulos extracelulares o intracelulares al ensamblaje y organización de la actina del citoesqueleto [121, 122].

En las células de mamíferos las proteínas Rho (RhoA, Cdc42 y Rac) están activadas por señales extracelulares específicas y dirigen la organización de la actina del citoesqueleto para inducir cambios morfológicos característicos [123]. Se ha observado en líneas celulares derivadas de fibroblastos que las RhoGTPasas parecen actuar en una cascada en la cual Cdc42 activa a Rac y ésta a su vez activa a Rho. La microinyección de la proteína Rac en células en cultivo provoca incremento en la formación de lamelipodios y replegamientos (*rufflings*). En cambio, mutantes negativos de Rac inhiben la formación de lamelipodios inducidos normalmente por diversos factores de crecimiento como PDGF, EGF, o insulina.

Esto indica que la respuesta a estos factores es dependiente de Rac. Por otro lado, la inyección de Ras activado también induce replegamientos o rizos de la membrana en una vía dependiente de Rac, sugiriendo que Ras actúa hacia arriba de Rac. En cambio, la microinyección de la proteína Rho o la activación de Rho por LPA produce la aparición de grandes haces de filamentos de actina, conocidos como fibras de estrés, y el incremento de contactos focales; mientras, la activación de Cdc42 por bradicinina provoca la formación de microespículas periféricas de actina incluida la filopodia [124, 125]. La formación de filopodios por Cdc42 es importante para la movilidad celular [126].

Las moléculas de adhesión como integrinas, caderinas y miembros de la superfamilia de Ig afectan la actividad de Rho, Rac o Cdc42 [115-117]. Al formar uniones célula-célula las caderinas son capaces de activar a Rac y Cdc42 [127]. La activación de estas proteínas G ayudaría a las funciones de caderinas, mostrando un *feed-back* positivo. Por otro lado, este compromiso entre caderinas sería inhibitorio de la función de Rho, al incrementar la actividad de p190RhoGAP [118].

La presencia de fibras de estrés es modulada por el tipo de proteínas presentes en la matriz extracelular y en el medio en el que las células son cultivadas. Las fibras de estrés se encuentran conectadas a la membrana plasmática a través de complejos multiprotéicos, conocidos como contactos focales, donde las integrinas trans-membrana son asociadas directa o indirectamente con un gran número de proteínas estructurales y de señalización [128].

El ensamblaje de fibras de estrés mediado por Rho resulta en la contractilidad de fibras de miosina. Rho activa es capaz de fosforilar la cadena liviana de miosina (MLC), de esta manera aumentando su actividad contráctil [129]. Por otro lado, fue demostrado que un efector de Rho, Rho-kinase (ROCK o ROK), también eleva los niveles de MLC fosforilado al inhibir la fosfatasa de MLC [130]. Además, ROK es capaz de tomar el lugar de la quinasa de MLC (MLCK), fosforilando directamente la MLC regulatoria, incrementando la activación de miosina [131]. Todos estos datos indicarían que Rho promueve la contractilidad de la miosina y la tensión resultante desemboca en la formación de fibras de estrés y adhesiones focales.

Otra proteína efectora de Rho activo es mDia (*mammalian homolog of diaphanous*) [132]. La sobreexpresión de esta proteína en su forma activa induce el ensamblado de una formación de finas fibras de estrés, que serían menos empaquetadas que las formadas por la expresión de Rho activo o ROK. La densidad y apariencia de las fibras de estrés pueden modificarse experimentalmente expresando diferentes niveles de ROK y mDia [132]. A diferencia de ROK, que actuaría sobre las cadenas livianas de la miosina, mDia actuaría en la polimerización de la actina [133].

El mecanismo básico de formación de “*ruffles*” de membrana por Rac es la polimerización de la actina. Rac activo es capaz de disociar la proteína WAVE de un complejo. Esta proteína es capaz de inducir la estimulación de la actividad de polimerización de Arp2/3 [134]. Otro efector de Rac (también de Cdc42) es la proteína PAK (*p21 activated kinase*). La expresión de esta quinasa es capaz de formar Lamelipodia [135] e inhibir la formación de fibras de estrés y contactos focales [136].

La activación de Rac mediada por factores de crecimiento antagoniza la formación de fibras de estrés y contactos focales inducidos por Rho [137]. Una explicación es que PAK, al ser activada por Rac, fosforila e inhibe la quinasa de la cadena liviana de miosina, inhibiendo la fosforilación de MLC.

h. Proteínas de la familia Rho y cáncer

Las GTPasas Rho desempeñan un papel importante en el control del crecimiento y la proliferación celular. Es conocido que estas proteínas estimulan la progresión de la fase G1 del ciclo celular y la síntesis de ADN, así como vías de señalización que activan gran variedad de factores de transcripción nuclear [138, 139]. Además, se ha demostrado que las proteínas Rho poseen un potencial transformante en algunas líneas celulares y muchos GEFs para Rho, Rac y Cdc42 son oncogénicos [94, 125, 140]. Asimismo, Rho y Rac constitutivamente activados incrementan el crecimiento celular e inducen crecimiento independiente y formación de tumores. [141, 142]. Rac, pero no Rho, provoca transformación maligna en fibroblastos de roedores y Cdc42 activado induce la formación de tumores en ratones desnudos. Por otro lado, Rac, Rho y Cdc42 son esenciales para la transformación maligna inducida por Ras y existen datos experimentales que demuestran

que la coexpresión de Rac1 y RhoA con Raf-1 provoca una actividad transformante cooperativa. De forma similar, la coexpresión de Rac1 y RhoA activados con Ras oncogénico causa un gran incremento de la transformación morfológica. En cambio, la coexpresión de mutantes dominantes negativos de Rac1, RhoA y Cdc42 reduce la actividad transformante de Ras en fibroblastos de roedores. Tales observaciones indicarían que las proteínas Rho probablemente contribuyen a las acciones transformantes de Ras; sin embargo, los cambios morfológicos observados en las células transformadas podrían ser causados, en parte, por desregulación de la función de las proteínas Rho, porque en las células transformadas por Ras no se han descrito niveles constitutivamente elevados de alguna proteína específica de la familia Rho.

Finalmente, existe un conjunto de evidencias obtenidas de modelos experimentales de cáncer en animales que demuestran una relación inversa entre los niveles de expresión de β -actina y el grado de diferenciación celular. El aumento de expresión de este gen en el proceso de carcinogénesis puede considerarse partiendo del hecho de la participación de los filamentos de actina en los fenómenos biológicos de división celular, interacciones celulares, adhesión y migración celular. De este modo, la desorganización de estos filamentos, observada en fibroblastos transformados, podría estar asociada con un aumento en la motilidad de las células tumorales en cultivo y con un incremento del potencial metastático *in vivo* [122, 143].

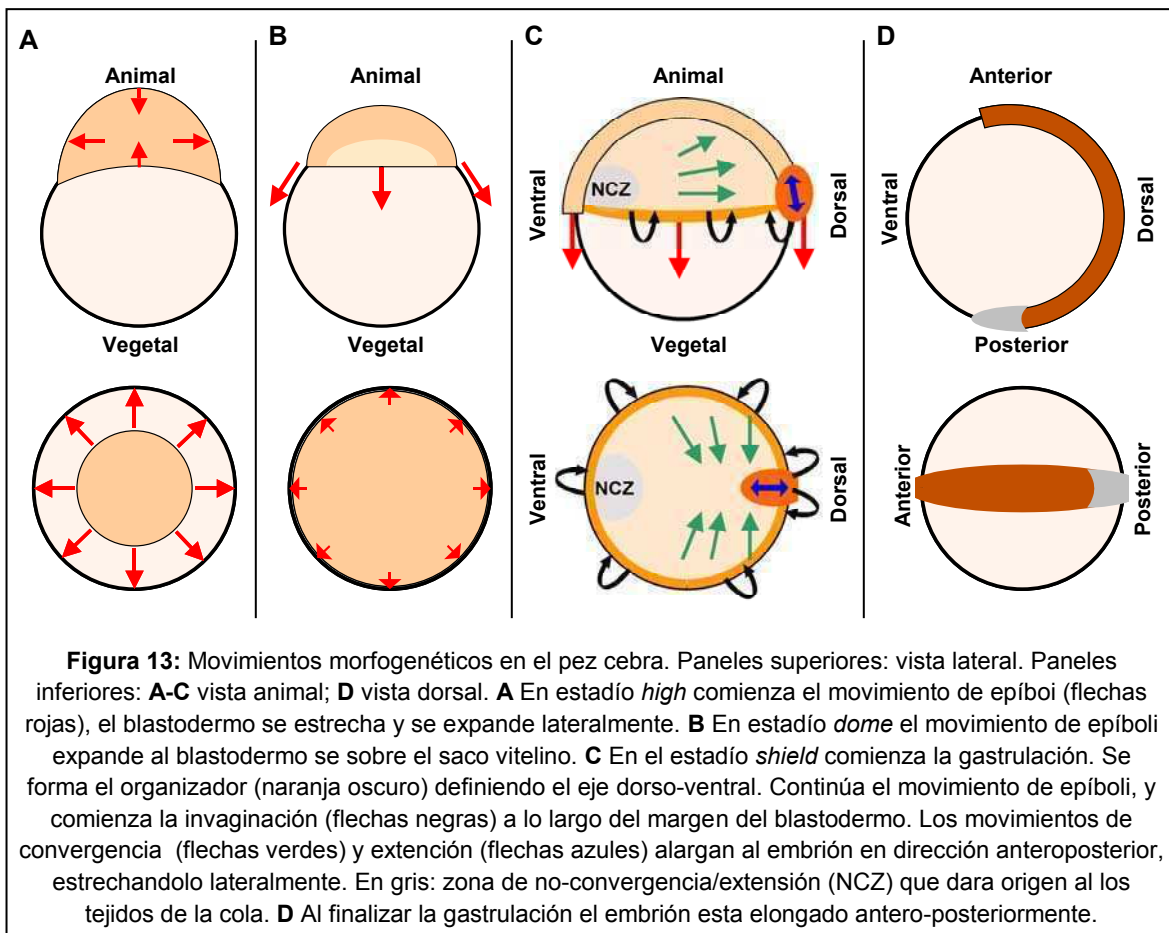
I.3 Proteínas de la familia Rho y el desarrollo embrionario

a. Desarrollo temprano; gastrulación

La gastrulación es el proceso morfogenético de formación de las diferentes capas celulares (endodermo, mesodermo y ectodermo) que darán lugar a los diferentes tejidos. En vertebrados la gastrulación consiste en la coordinación de cuatro movimientos conservados: internalización, epíboli, convergencia y extensión. Durante la internalización las células que darán lugar al endodermo y al mesodermo se mueven por debajo del futuro ectodermo a través del blastoporo. El blastoporo es una abertura en la blástula que normalmente tiene forma de poro. En el pez cebra, en cambio, el blastoporo es una rajadura a lo largo del margen del blastodermo y se lo conoce como “margen del blastodermo”. El margen del blastodermo terminará siendo un poro al completarse la epíboli. Epíboli es el movimiento por el cual el blastodermo se estrecha y se expande, mientras los movimientos de convergencia y extensión alargan el embrión en dirección antero-posterior, estrechándolo lateralmente (Figura 13). Estos movimientos son el resultado de varios procesos celulares que incluyen: cambios en la forma, tamaño, polaridad y adhesión de las células, intercalación radial y lateral, y migración. Estos comportamientos son gatillados por señales extracelulares que incluyen: factores de crecimiento, interacciones con la matriz extracelular e interacciones con otras células [144]. Los movimientos celulares dependen del citoesqueleto de actina y éste está regulado de forma dinámica por los miembros de la familia de proteínas G monoméricas de la familia de Rho [122].

En *Xenopus*, la coactivación de Rho y Rac de forma independiente por la vía de señalización de Wnt/Frizzled es necesaria para la gastrulación. Ambas proteínas G se activan luego de la unión de Wnt a su receptor, activando vías de señalización río abajo que regulan la forma celular, la formación de lamelipodia y filopodia y el movimiento celular. Estos procesos regulan los movimientos de convergencia y extensión [145]. La sobreexpresión de Rac y de Rho interrumpe la gastrulación. Tanto mutantes dominantes negativa (dn) de Rac (RacN17) y de Rho (RhoN19) como constitutivamente activas (ca) (RacV12; RhoV14) tienen el mismo efecto en el desarrollo del embrión. [146]. Los embriones que expresan las Rho GTPasas muestran un retraso en la involución del mesodermo comparados con embriones control, y en algunos casos el blastoporo no llega a

cerrarse. Estos embriones se desarrollan con múltiples defectos de gastrulación anteriores y axiales. Estos fenotipos son consistentes con una falla en la inducción de mesodermo anterior o por una inhibición de la migración de las células a la porción anterior, afirmando un papel importante de las Rho GTPasas en la formación de la cabeza [147]. Los defectos axiales en la gastrulación incluyen fallas en cerrado del proectodermo, espina bífida, y un acortamiento de eje antero-posterior. El defecto en el proectodermo y la espina bífida son debido al defecto de cerrado del blastoporo y todos estos fenotipos están asociados a fallas en los movimientos de convergencia y extensión del mesodermo axial y paraxial [148]. Si bien las Rho GTPasa se encuentran río abajo de señales de diferenciación, los embriones expresando las diferentes mutantes de Rho y Rac no presentan defectos en la inducción o diferenciación del mesodermo, y los defectos se deben principalmente a fallas en la migración celular [146].



En *zebrafish* tanto Rac como Rho median movimientos de convergencia y extensión sin afectar el destino celular. La proteína Has2, una enzima que sintetiza el polisacárido lineal de la matriz extracelular hialuronano, es necesaria para la migración dorsal mediada por Rac [149]. Embriones *knock-down* para Has2 carecen de este polisacárido en la matriz extracelular y presentan defectos morfogénicos pero no tienen afectado el patrón dorsoventral. Estos defectos se deben a fallas en los movimientos de convergencia dorsal y no en movimientos de extensión, y están mediados por Rac. El polisacárido hialuronano es necesario para la activación de Rac, estimulando la formación de lamedopodia e induciendo polaridad celular, ambos procesos necesarios para la migración [149].

La proteína Rok2 (Rho kinase 2) es una proteína quinasa activada por Rho. Esta se expresa durante el desarrollo temprano, y media la polaridad celular y los movimientos de convergencia y extensión mediados por el factor morfogénico Wnt11 [150]. La actividad de Rok2 es necesaria de forma celularmente autónoma para la correcta elongación celular, mientras que la orientación celular necesita de ambas actividades celularmente autónoma y no autónoma de Rok2. Las células en la gástrula son capaces de elongarse independientemente de su orientación, indicando que la orientación y la elongación durante los movimientos de convergencia y extensión son fenómenos independientes, ambos gobernados por la vía no canónica de señalización por Wnt, Wnt11-Rho-Roc2 [150].

En ratón, Rac1 es necesaria para la formación de los tres estratos germinales. Embriones *knock-out* para Rac1 mueren antes del estadio E9.5, debido a que la falta de Rac1 causa arresto del desarrollo y muerte celular de las células mesodérmicas generadas durante la gastrulación. Explantes celulares de embriones *knock-out* son incapaces de formar lamedopodia, tienen adhesión anormal, y son poco móviles [151].

En *Drosophila*, se identificaron cinco miembros de la familia de pequeñas proteínas G monoméricas de Rho: Rho1, RhoL (RhoLike), dRacA, dRacB y dCdc42 [152, 153]. Un sexto gen, Mtl, codifica para una GTPasa estructuralmente similar a Rac y Cdc42 [154] pero que se comporta como Rac1 y Rac2. Por ende, Rac1, Rac2 y Mtl se conocen como la subfamilia de Rac en *Drosophila* [155]. Estudios utilizando mutantes dominantes negativas y constitutivamente activas de estas proteínas muestran que están involucradas en varios procesos relacionados con cambios en la forma celular, en la regulación del citoesqueleto de

actina y en el movimiento celular. Mutaciones en Rho1 causan efectos directos en el citoesqueleto de actina, interrumpiendo la morfogénesis y segmentación durante el desarrollo temprano [156]. Por otra parte triples, mutantes para las isoformas de Rac no presentan lamedopodias ni filopodias, ni acumulan actina en el frente de avance (*leading edge*) epitelial. Como consecuencia de esto no se llega a completar el cierre dorsal (las laminas epiteliales laterales opuestas se juntan y fusionan en la línea media dorsal) y el embrión es inviable [155].

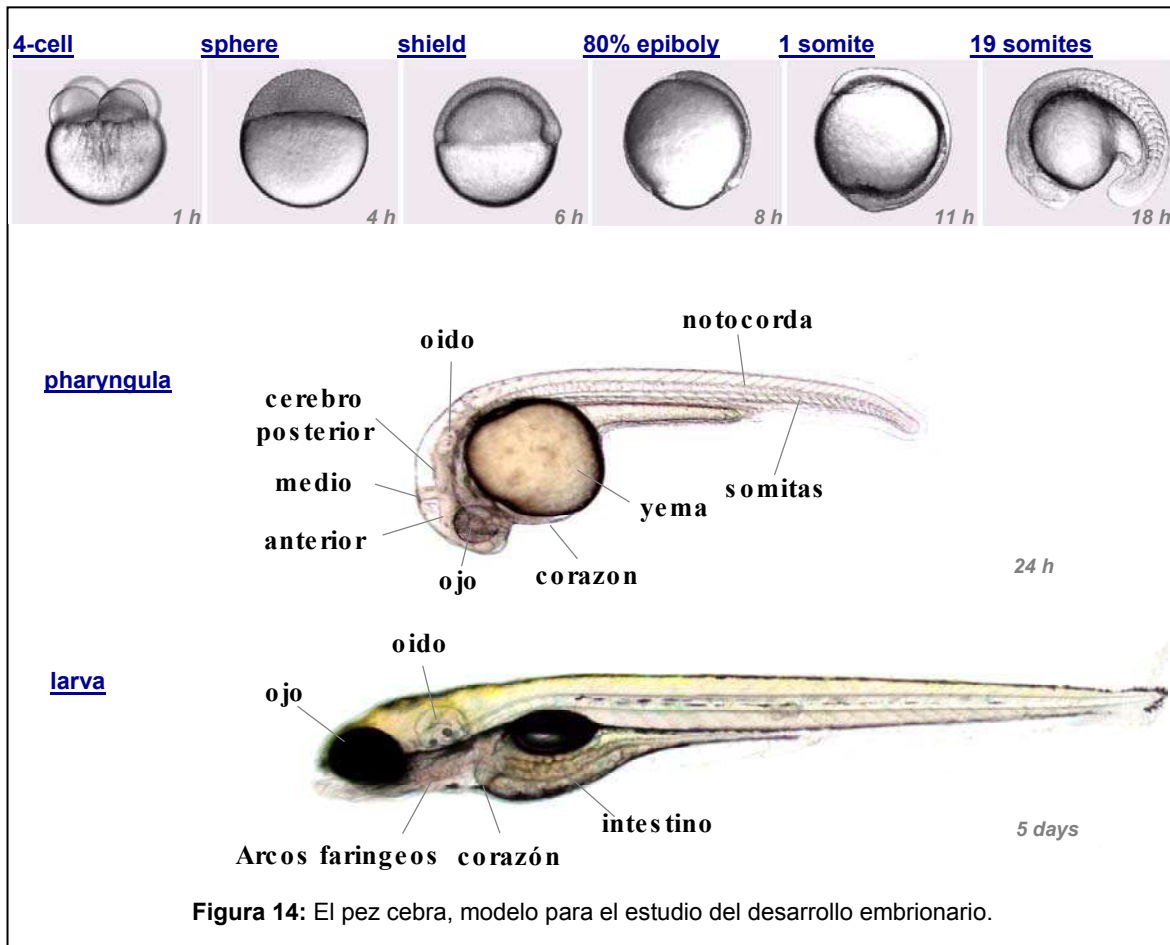
b. Desarrollo del sistema nervioso

Las neuronas migran un largo camino hasta su destino final donde comienzan a diferenciarse. Luego emiten dos tipos de proyecciones, un solo axón, y múltiples dendritas. Una vez que esta polaridad esta establecida, el axón navega a través de un ambiente complejo para establecer una conexión específica. El papel más estudiado de las Rho GTPasas durante el desarrollo embrionario es el de la regulación del crecimiento axonal y la guía de los axones, tanto en *Drosophila* y *C. elegans* como en vertebrados. Las proyecciones axonales de las neuronas se extienden largas distancias hasta hacer conexiones precisas con dianas específicas. Los axones son guiados por los conos de crecimiento, estructuras dinámicas y móviles que se encuentran en el extremo distal de los axones [157]. Señales extracelulares sirven de guía para que el axón encuentre su camino. Estas señales son detectadas por receptores transmembrana en la membrana del cono de crecimiento. La activación de estos receptores desencadena la remodelación del citoesqueleto de actina, la formación de lamedopodia y filopodia y el consecuente movimiento y prolongación del axón en una dirección dada [158], siendo estos procesos mediados por las GTPasas de la familia de Rho [122]. En *Drosophila*, la expresión de dominantes negativas o formas constitutivamente activas de Rac resulta en crecimiento anormal de los axones pero no de las dendritas. En cambio, mutantes de Cdc42 afectan tanto a axones como a dendritas, mientras que Rho actúa como un regulador negativo, mediando la retracción de las neuritas [159]. En ratones transgénicos expresando Rac constitutivamente activa en células de Purkinje se observa un efecto similar en los axones sin afectar las dendritas [160].

c. Danio rerio (zebrafish) como modelo de desarrollo embrionario

El pez cebra, o *zebrafish*, es originario de los ríos tropicales de la India y fue durante mucho tiempo un pez muy común en acuarios y tiendas de mascotas. En 1986 George Streisinger de la Universidad de Oregon publicó un manuscrito donde sugería que el pez cebra podía ser utilizado como un modelo para el análisis genético del desarrollo embrionario en vertebrados [161]. En 1992 Christiane Nusslein-Volhard, quien compartió el premio Nobel con Eric Wieschaus por sus trabajos en *Drosophila*, decidió repetir los experimentos de mutagénesis a gran escala en *zebrafish* [162]. Este trabajo de genética reversa dio a conocer gran parte de los genes involucrados en el desarrollo embrionario que conocemos hoy y fueron publicados todos ellos en un número de la revista *Development* conocido como “*The Zebrafish Issue*” [163]. Este trabajo se realizó en el Instituto Max-Planck de la ciudad de Tübingen en Alemania, por lo que la cepa utilizada para este trabajo se conoce como Tübingen (Tü) y los mutantes resultantes de este “*screening*” se conocen como los mutantes de Tübingen. Esta misma cepa es la que se está utilizando para secuenciar el genoma del *zebrafish*.

Como modelo para el estudio del desarrollo de vertebrados ofrece muchas ventajas. Los embriones son transparentes, y la fertilización es externa, con lo cual están disponibles todos los estadios del desarrollo y permite seguir con detalle las primeras divisiones celulares y la formación de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). El desarrollo es rápido. En 24 horas post fertilización (hpf) el corazón está latiendo, ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y las somitas (precursores de músculo y esqueleto) [164]. Todos los órganos o sus primordios están en su lugar luego de 5 días post fertilización (dpf) y los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales (Figura 14). En este momento el pez es perfectamente capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento [165]. Los peces adultos miden aproximadamente 3 cm y pueden criarse en gran número. Los análisis genéticos y la disponibilidad de material biológico se facilitan por la cantidad de embriones (entre 100 y 200 individuos) que una sola pareja de peces puede producir con intervalos semanales [166].

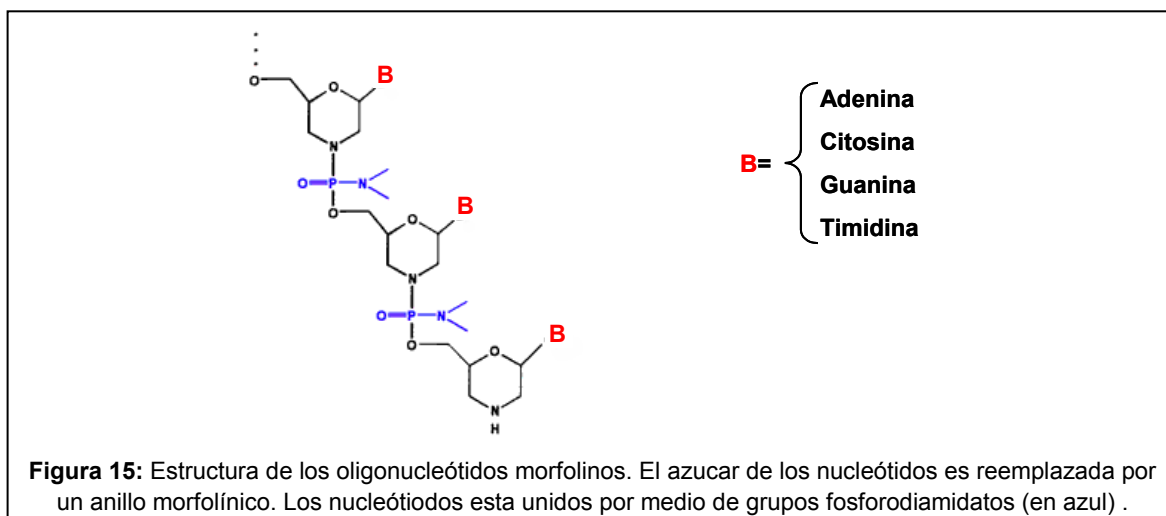


El genoma de zebrafish es de alrededor de 29 Morgans y $1,7 \cdot 10^6$ kb, la mitad del tamaño del humano, se está secuenciando y ya existen mapas muy precisos de marcadores genéticos. Además de una descripción detallada de la anatomía del embrión, se han desarrollado metodologías robustas que permiten: localizar proteínas *in vivo* por medio de fusiones con (GFP) [167], apagar genes específicos empleando morfolidos, y la ablación y el transplante de células [168].

d. Oligómeros antisentido “morfolidos”

Se conoce como morfolidos (*morpholidos*) a oligonucleótidos no iónicos sintetizados a partir de cuatro subunidades, cada una de las cuales contiene una de las cuatro bases genéticas unidas a un anillo morfolino hexagonal, unidas por medio de grupos fosfordiamidatos (Figura 15). Estos oligómeros tienen entre 18 y 25 bases de largo, y son

diseñados para unirse complementariamente a secuencias específicas de ARN [169]. Los morfolinos son altamente solubles en agua y presentan muy poca o ninguna actividad no específica o toxicidad. Son muy estables, inmunes a nucleasas, y sus costos de producción son reducidos. Han sido utilizados con éxito para el apagado de diversos genes. Típicamente se diseñan complementarios a la región de inicio de la traducción, ya sea sobre el ATG mismo o pocas bases río arriba, bloqueando de esta manera la traducción de todo el ARN mensajero (materno y zigótico). También se los puede diseñar para bloquear el procesamiento del ARN y así sólo “apagar” solo los genes zigóticos. En este caso la secuencia será complementaria a una región de unión exón-intrón [168].



II- Métodos

II.1 Cultivo de células:

a. Líneas celulares

COS-1: Células CV-1 que llevan integrada una copia de la región temprana del genoma del SV-40, ATCC: CRL-1.650.

HEK-293-T: Células 293 (ATCC: CRL-1573, línea celular originada a partir de células epiteliales de riñón de embrión humano transformadas con el ADN del adenovirus humano tipo 5, que llevan integrada una copia de la región temprana de SV40.

Neuro2a: Línea celular derivada de neuroblastoma de ratón. (ATCC) CCL-131

Estas células fueron crecidas en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Life Technologies), 4 mM glutamina (Life Technologies), 100 U/ml penicilina y 0,1 mg/ml estreptomina (Life Technologies).

b. Transfecciones transientes

Las transfecciones se llevaron a cabo en todos los casos utilizando FuGene (Roche). Las transfecciones transientes con FuGene fueron realizadas en placas de 6 pocillos, con 350.000 células/pocillo. Se utilizaron entre 500 ng y 1 µg de ADN plasmídico por pocillo. El protocolo de transfección utilizado fue el recomendado por el fabricante.

c. Infecciones con adenovirus

Para las infecciones con virus, células 60% confluentes fueron deprivadas de suero por 2 horas, y incubadas con el virus en medio sin suero por otras dos horas. Luego se lavaron las células con PBS y se añadió medio fresco complementado con FBS y se dejó toda la noche. Luego se procedió según los requerimientos de cada ensayo. Para el cálculo de la multiplicidad de infección (MOI) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{MOI} = \text{pfu}/\mu\text{l} \cdot \text{Número de células}^{-1}$$

d. Obtención de lisados celulares para los ensayos de unión a GST-β2-chimaerin

Células Neuro2a fueron crecidas hasta alcanzar un 90% de confluencia. Para el tratamiento con pervanadato sodio se agregó 1 mM de ortovanadato de sodio y 1 nM de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo por 30 minutos. Las células fueron lavadas con PBS frío colectada con buffer de unión (20 mM Tris pH 7,4; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% octilglucósido; 2 mM DTT; 1mM PMSF; 1 mM NaFl; 1mM benzanida; 10 mM β-glicerofosfato; 2 mM Na₂PO₄). Luego los lisados se sonicaron 3 veces por 15 segundos y se centrifugaron por 15 minutos a 12.000 X g. El sobrenadante fue utilizado para los experimentos de unión a GST-β2-chimaerin.

e. Fraccionamiento subcelular

Las células fueron crecidas en placas de 6 pocillos hasta alcanzar el 80-90% de confluencia. Luego de tratarlas con 5 mM del inhibidor de PKC GF 109203X por 30 minutos, se las incubo con distintas concentraciones de PMA por 20 minutos. Las células fueron lavadas con PBS a 4°C y mantenidas sobre hielo de aquí en adelante. Se colectaron las células con 200 µl de buffer (20 mM tris pH 7,5; 5 mM EGTA + inhibidores de proteasas). Las células fueron lisadas por sonicación, 3 veces por 10 segundos a baja potencia. 150 µl fueron centrifugados por 1 hora a 100.000 X g, el resto se conservó como fracción total. Se recuperó el sobrenadante (fracción soluble) y se resuspendió el *pellet* en buffer de siembra (fracción insoluble). Se procedió a resolver las distintas fracciones por PAGE-SDS.

f. Inmunofluorescencias

Se sembraron las células sobre cubreobjetos al 50% de confluencia. Transcurridas 12 horas las células fueron transfectadas y tratadas según se indique. Las células fueron fijadas en una solución de ácido *p*-formaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente y lavadas 3 veces con PBST durante 2 minutos. Tras incubar con solución de bloqueo (5% BSA en PBST) las células se incubaron con el anticuerpo primario en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces con PBST durante 2 minutos y posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con FITC o Cy3

durante 2 horas, luego de lo cual se lavó 5 veces con PBST durante un total de 2 horas. Las muestras fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje *Vectashield* (con o sin DAPI) (Vector) y visualizadas al microscopio óptico o confocal según el caso.

g. Sincronización del ciclo celular

Para sincronizar las células en prometafase se utilizó el método de doble ronda. Primero células COS1 se incubaron por 24 horas con hidroximetil urea. Este compuesto arresta a las células en fase S (síntesis). Luego de remover la hidroximetil urea lavando con PBS se incubaron por 12 horas con nocodazol. Este compuesto arresta las células al comienzo de la fase M (mitosis). Tras remover el nocodazol lavando con PBS se incubaron las células con medio completo. Se siguió el comportamiento de las células por medio del análisis del contenido de ADN por citometría de flujo utilizando ioduro de propidio y por microscopia utilizando tinción con DAPI (4-6-diamino-2-fenilindol).

h. Inmunoprecipitaciones

Para las inmunoprecipitaciones se lisaron las células en buffer NP40 (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% NP40; inhibidores de proteasas). Los lisados fueron colectados y centrifugados por 10 minutos a 14.000 X g. Se guardó una fracción del sobrenadante (fracción total) y el resto del sobrenadante se incubó a 4°C por 30 minutos con el anticuerpo correspondiente a la concentración indicada por el fabricante. Se agregaron 20 ml de Gammabind-Sepharosa (Amersham Pharmacia) y se incubó 30 minutos a 4°C en rotor. Se centrifugaron las muestras 2 minutos a 14.000 X g a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavaron las bolitas de sefarosa con buffer NP40 dos veces. Se agregó 15 ml de buffer de muestra y luego se incubó a 95°C por 5 minutos. Las muestras se resolvieron por PAGE-SDS.

II.2 Cultivo de bacterias:

a. Transformación de bacterias

Se transformaron bacterias competentes con diferentes plásmidos o productos de ligaciones. A 50 μ l de bacterias competentes se le agrega aproximadamente 1 ng de ADN plasmídico, o 2 μ l de reacción de ligación y se agita suavemente para mezclar. Se incuban 5 minutos en hielo y luego se procede con el golpe de calor incubando a 42°C por 45 segundos. Se deja 5 minutos en hielo y se agrega 0,9 ml de LB. Se incuba 1 hora a 37°C con agitación, luego se plaquea 100 μ l en placas de LB agar con ampicilina o kanamicina y se incuba toda la noche a 37°C. Se pican las colonias de interés y se crecen en 3 ml de medio líquido con antibiótico para preparación plasmídica.

Soluciones:

LB (1 litro): 0.5% p/v extracto levadura, 1% p/v bacto-triptona, 1% p/v NaCl

LB agar: LB + 1.5% p/v bactoagar

LB/ampicilina: 50 μ g/ml (tanto en medio sólido como líquido)

LB/ kanamicina: 100 μ g/ml (tanto en medio sólido como líquido)

b. Producción de proteínas recombinantes

Bacterias BL21, transformadas con plásmidos derivados del pGEX fueron crecidas en LB con ampicilina 50 mg/ml. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 0,5 a una longitud de onda de 600 nm, se indujo la expresión durante 3-6 horas a 37°C con 1 mM de IPTG. Transcurrido este tiempo las células se centrifugaron a 13.000 X g a 4°C durante 10 minutos y se lisaron en PBS en presencia de inhibidores de proteínas. Después de sonicar se centrifugaron y se purificaron las proteínas por incubación con bolas de glutation-sepharosa 4B durante 1 hora a 4°C en rotación, seguido de varios lavados con el buffer de lisis. Las proteínas de fusión fueron eluidas con glutation reducido en el caso que fuera necesario. Para deshacerse del glutation y otras sales se utilizaron columnas de tamiz molecular PD-10 (Pharmacia Biotech). Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas resolviéndolas en un gel de acrilamida con un patrón conocido de BSA y tiñendo con azul de Coomassie.

II.3 Construcción, clonado y amplificación de ADN recombinantes

a. Minipreparación de ADN plasmídico

Se utilizó el kit *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este protocolo está basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado [170]. Luego de lisis, el DNA genómico es eliminado por centrifugación. El DNA plasmídico es adsorbido en una membrana de sílica en presencia de alta concentración salina, lavado con una solución de etanol concentrado, y luego eluido en buffer TE.

b. Preparaciones a gran escala de ADN plasmídico

Se utilizaron columnas de intercambio iónico *Tip 500* de *Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este protocolo está basado en un procedimiento de lisis alcalina modificado [170], seguido de una purificación del DNA plasmídico por medio de una columna de intercambio iónico. El DNA se une a la columna, y luego se remueve el RNA, proteínas, solventes e impurezas de bajo peso molecular con una concentración media de sal. Finalmente el DNA es eluido con un buffer de alta salinidad, y concentrado y desalado por precipitación con 0,7 volúmenes de isopropanol y posterior lavado con etanol 70%. El rendimiento de estas maxi-preparaciones es aproximadamente de 500 µg de ADN plasmídico.

c. Geles de agarosa nativos

Los geles de agarosa utilizados se prepararon con buffer TBE 1X al 0,7-1,5% con bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron a 5-10 V/cm. A las muestras se les agregó el correspondiente volumen de buffer de siembra 6 X. Los geles fueron visualizados y fotografiados con luz ultravioleta (UV). Se utilizaron los marcadores de peso molecular *1 kb* y *100 bp DNA Ladder* (New England Biolabs).

Soluciones

TBE 10X: (1 litro) 108 g Tris base, 55 g ácido bórico, 40 ml 0,5 M EDTA pH 8.

TE: 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8.

d. Cuantificación de ADN

Las muestras de ADN se cuantificaron por medición de la absorbancia a 260 nm (Abs260nm). Las concentraciones se calcularon conociendo la Abs260 nm y teniendo en cuenta el factor de dilución, teniendo en cuenta que 1 unidad de Abs260 nm equivale a 50 ng/ μ g de ADN. También se cuantificaron muestras de ADN por electroforesis en gel de agarosa, comparando las intensidades observadas bajo luz UV con las intensidades dadas por cantidades conocidas de ADN del marcador de peso molecular *1 kb DNA Ladder* (New England Biolabs)

e. Digestión de ADN con enzimas de restricción

El análisis de ADN por digestión con enzimas de restricción se realizó en las condiciones de temperatura y salinidad indicadas por el manual del fabricante (New England Biolabs, Roche, Life Technologies). Se utilizaron las unidades enzimáticas y los buffers recomendados para cada enzima.

f. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN se purificaron utilizando el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Los fragmentos de ADN a purificar se separaron por electroforesis en gel de agarosa en buffer TBE 1X. La banda correspondiente al fragmento de interés se cortó bajo luz UV y se siguieron las instrucciones del fabricante.

g. Reacciones de ligación y transformación

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo intentando respetar una relación inserto:vector de 3:1, utilizando 30 ng de vector. Las reacciones se llevaron a cabo en 10 μ l de volumen final, utilizando 1 U de la enzima ADN ligasa del fago T4 (Roche). Se incubó a 16°C durante toda la noche o a temperatura ambiente dos horas. Como control se incubó el vector con enzima y buffer, pero sin agregar inserto. Se transformaron bacterias competentes con 2 μ l de la reacción de ligación (con y sin ligasa), como ya fue descrito.

II.4 Análisis de proteínas

a. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (PAGE-SDS)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron utilizando el sistema *MiniProtean* (Bio Rad). Se prepararon geles de 8, 10 o 12% de acrilamida con SDS. Las muestras se incubaron a 95°C en buffer de siembra por 5 minutos. Los geles se corrieron a 100 v durante una hora utilizando marcadores de peso molecular (Bio Rad).

b. Westerns blot

Las proteínas resueltas por PAGE-SDS se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) mediante electrotransferencia utilizando el sistema *MiniProtean* (BioRad). Estas membranas se bloquearon por 2 horas en solución de bloqueo.

Se lavan con TBST dos veces 5 minutos cada una y se agrega el primer anticuerpo 1:1.000 en TBST y se deja por 1 hora o toda la noche. Se hacen 3 lavados con TBST de 5 minutos cada uno y se incuba con el segundo anticuerpo (1:10.000 en TBST) por 30 minutos. Este anticuerpo reconoce la Fc (fracción constante) del primer anticuerpo tiene acoplado la proteína HRP (horse-radish peroxidase)

Se hacen 3 lavados con TBST de 15 minutos cada uno y se incuba con la solución de quimioluminiscencia por 1 minuto. Se expone con placa radiográfica.

c. Tinción de Coomassie

Los geles fueron removidos de los vidrios, e incubados en solución de azul de Coomassie por 30 minutos, luego de lo cual se lavaron extensivamente hasta alcanzar el contraste deseado y fueron secados sobre papel Whatman 1 hora a 80°C en un equipo *Gel Dryer 583* (Bio Rad)

Soluciones:

Buffer de siembra: 0,3125M Tris pH 6,8; 10% SDS; 25% glicerol; 0,05% bromo fenol blue; 10% β mercaptoetanol.

Buffer de corrida Tris-glicina-SDS: 25 mM Tris; 192 mM glicina; 0,1% SDS ajustar a pH 8,3.

Buffer de transferencia: 25 mM Tris, 192 mM glicina; 20% de metanol.

TBST: Tris 20mM pH 7,5; NaCl 9g/litro; 0,05% Tween-20.

Solución de bloqueo: 5% leche en polvo descremada en TBST.

Solución de quimioluminiscencia: Al momento de usar mezclar volúmenes iguales de solución 1 (2,5 mM luminol; 400 mM ácido p-couramico; 100 mM Tris pH 8,5) y solución 2 (5,4 mM H₂O₂; 100 mM Tris pH 8,5)

Azul de Coomassie: 0.25 g de Azul de Coomassie R250 por cada 100 ml de solución de lavado.

Solución de lavado: 40% metanol, 10% ácido acético, 50% H₂O.

d. Ensayo de medición de los niveles de Rac y Cdc42-GTP in vivo

Para este ensayo las células son lisadas en buffer GLPD (20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,5% NP-40; 5 mM MgCl₂; 5 mM β-glicerofosfato; 1 mM PMSF; 10 mg/ml leupeptina; 10 mg/ml aprotinina; 10 mg/ml pepstatina A) con 5 mg de la proteína GST-PBD por pocillo. Después de centrifugar a 12.000 X g a 4°C durante 10 minutos, los sobrenadantes se incubaron con glutation-sepharosa 4B durante 30 minutos a 4°C. Los precipitados se lavaron 3 veces con buffer de GLPD. Las proteínas se eluyeron con buffer de muestra de electroforesis a 100 °C durante 5 minutos y se resolvieron en 15% PAGE- SDS. Se detectaron los niveles de Rac y Cdc42 en los precipitados por Western blot.

e. Ensayos de retención de proteínas en columnas

Proteínas recombinantes fueron producidas y purificadas como se describió previamente. Las proteínas de fusión no fueron eluidas de la sefarosa, y se procedió a inmovilizar la sefarosa con la proteína unida en columnas “*disposable columns for bulk GST purification*” (Amersham Pharmacia). Las columnas fueron lavadas con buffer de lisis (ver *Producción de proteínas recombinantes*) dos veces, y se intercambió el buffer lavando 5 veces con 5 ml cada una con buffer de unión (ver *Obtención de lisados celulares para los ensayos de unión a GST-β2-chimaerin*). Luego de pasar los lisados celulares por las columnas, se lavaron 5 veces con 5 ml cada vez con buffer de unión. Se tapó la columna por el extremo inferior, y se agregaron 0,5 ml de solución de eluido (10 mM glutation reducido

en 50 mM Tris pH 8). Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se colectó el eluido. Se repitió esta operación, y se obtuvieron 1 ml de eluido por columna. Estos fueron concentrados con columnas Centricon YM 30 (Millipore) según las indicaciones del fabricante. Las fracciones obtenidas fueron resultas por PAGE-SDS como se indica.

f. Ensayos de unión a ésteres de forbol

Se utilizó proteína recombinante purificada como se indicó previamente. La unión del radioligando [³H]PDBu a GST-z-chimaerin fue medida utilizando el ensayo de precipitación con polietilen glicol como describe [1].

II.5 Zebrafish

Todos los métodos para la manipulación de peces cebra se encuentran recopilados en “*The Zebrafish Book*” [165] y están disponibles en el sitio de Internet de “*The Zebrafish information Network*” www.zfin.org.

El cuidado y manutención de los peces adultos estuvo a cargo de personal técnico de la “*University of Pennsylvania Fish Facility*”.

Se utilizaron peces de la cepa Tübingen (Tü).

a. Recolección de embriones

Para colectar los embriones se utilizaron cajas individuales con insertos plásticos que poseen una trama metálica en la base que permite que los huevos caigan al fondo sin ser comidos por los padres. Las parejas de peces fueron preparadas el día de antes, dejando las hembras en el compartimiento de abajo y machos por encima de la trama metálica. Por la mañana, una hora después de empezado el ciclo de luz (8:00 horas) se colocó la hembra con el macho el compartimiento superior. Los huevos ya fertilizados comienzan a caer al fondo de la caja. Cuando se alcanza una cantidad suficiente (100 o más) se coloca el inserto con la pareja en una nueva caja, y se filtran los embriones con un pequeño colador. Los embriones se colocan en placas de Petri con medio E3 donde se los crece hasta el estadio deseado.

b. Síntesis de sondas de ARN

Para las hibridaciones *in situ*, se utilizaron como sondas ARNs complementarios a los mensajeros que se desean analizar. Para ello se utilizaron dichas secuencias clonadas en el plásmido pCRII (Invitrogen) que posee en cada uno de los extremos flanqueantes al sitio de clonado las secuencias promotoras SP6 y T7. Para la síntesis de la sonda se linearizaron 10 mg del ADN plasmídico a utilizar como templado, tratando con un enzima de restricción que corte en un solo sitio, toda la noche a 37°C. Luego se corrió el ADN digerido en un gel 1 % de agarosa en TBE y se purificó el ADN linearizado. Para la síntesis de la sonda se utilizó el kit comercial Genius 4 de Boehringer-Mannheim según las instrucciones del fabricante. Se utilizó en todos los casos la ARN polimerasa T7.

c. “Morfolinos”

Los oligonucleótidos morfolínicos antisentido fueron sintetizados por Gene Tools, LLC.

d. Síntesis de ARN mensajeros

Para las síntesis de ARN mensajeros se utilizó el *kit “mMessage mMachin Sp6”* (Ambion) según las instrucciones del fabricante. Las secuencias a sintetizar fueron clonadas en el plásmido pCS2-F que contiene un promotor Sp6 y señal de poliadenilación. En este proceso, se sintetiza ARN mensajero y se protege el extremo 5' con un análogo de *cap*. El ARNm “*cappeado*” fue purificado con columnas de filtrado en gel *Centri-Spin-10 Columns* (Princeton Separations) según el protocolo del fabricante.

e. Microinyecciones

Se utilizaron agujas de vidrio, hechas a partir de capilares de pared fina de 1 mm de luz (World Precision Instruments cat # TW 100f-4), estiradas con un equipo “*Micropipet puller model P-87*” (Suter Instruments Co.) y ajustado a las siguientes condiciones: *Heat* :900; *Pull* 70; *velocity* 70; *time* 70; *pressure* 600. Las agujas se llenaron por el extremo abierto con el mismo hacia arriba, y se dejó que el líquido baje por capilaridad. Para montar el manipulador-inyector, la aguja se coloca en un soporte fijado a un micromanipulador.

Dicho soporte está conectado al inyector PCI-90 (Medical Systems Corp). La punta de la agujas se cortaron manualmente con una pinza bajo lupa. Para calibrar la aguja se utilizo un portaobjetos milimetrado, cubierto con aceite mineral. Se ajustó la presión y el tiempo de inyección para regular el volumen de inyección.

Los embriones recién fertilizados se colocaron en un soporte de 2% agarosa en E3 y se procedió a inyectarlos. Se procuró inyectar a los embriones en el estadio de una célula. Se aplicó a cada embrión 10 nl de solución en el saco vitelino, justo por debajo de la célula.

Para las inyecciones dobles primero se llevó a cabo la inyección con morfolino y luego los embriones fueron sacados del soporte, mezclados y vueltos a fijar en el agar para la segunda inyección.

Para las inyecciones en la YSL se inyectaron los embriones con morfolinós y se incubaron hasta el estadio *high*. Los embriones fueron removidos del corion e inmovilizados y posicionados en un soporte de 2% agarosa en E3 donde se procedió a la inyección de la solución de ARNm en la YSL.

Para la inyección de morfolinós, se inyectaron 3 ng totales en un volumen de 10 nl de buffer de Danieau (58 mM NaCl; 0,7 mM KCl; 0,4 mM MgSO₄; 0,6 mM Ca(NO₃)₂; 5 mM HEPES pH 7,6) con rojo fenol.

Para la inyección de ARN mensajeros, se inyectaron 5 pg totales en 10 nl de solución 0,2 M KCl con rojo fenol.

f. Hibridizaciones in situ

Fijación:

Los embriones se fijaron en 4% PFA en PBS a 4°C durante una noche, luego de lo cual se lavaron con PBST (2 veces 10 min cada vez) y luego con agua.

Para embriones de menos de 2 dpf se quito el corion manualmente con pinzas.

Los embriones fueron incubados en metanol a -20°C por 2 horas mínimo. (Se pueden conservar en metanol a -20°C por largo tiempo).

Se llevaron los embriones a temperatura ambiente y se lavaron con PBST (2 x 10')

Digestión con proteinasa (para embriones en estadio de menos de más de 20 somitas):

Incubar con proteinasa-K en PBST a temperatura ambiente según:

20-30 somitas	5 min 10 ug/ml	2 dpf	30 min 8 ug/ml
24-27 hpf	10 min 10 ug/ml	3 dpf	30 min 10 ug/ml
30-36 hpf	15 min 10 ug/ml	4 dpf	30 min 15 ug/ml
48 hpf	20 min 10 ug/ml	5 dpf	30 min 20 ug/ml

Lavar con PBST varias veces y volver a fijar como antes

Hibridización:

Transferir los embriones a tubos de 1,5 ml (20-30 embriones por tubo, máximo 50 embriones) e incubarlos por 2 horas en solución de hibridización (HYB⁺) a 65°C.

Desnaturalizar la sonda incubándola a 90°C por 5 minutos y enfriar rápidamente en hielo. Diluir la sonda en solución HYB⁺ y llevar a 65°C. Añadir 100 µl de la sonda a los embriones e incubar a 65°C toda la noche.

Lavar 15 minutos cada vez a 65°C con:

- 100% HYB
- 75% HYB⁺/ 25% SSC 2X
- 50% HYB⁺/ 50% SSC 2X
- 25% HYB⁺/ 75% SSC 2X
- 100% SSC 2X

Lavar dos veces con SSC 0,2 X por 30 minutos a 65°C.

Lavar 5 minutos cada vez a temperatura ambiente con:

- 75% SSC 0.2X / 25% PBST
- 50% SSC 0.2X / 50% PBST
- 25% SSC 0.2X / 75% PBST

Lavar con PBST 2 veces por 10 minutos.

Detección:

Incubar con solución de bloqueo por dos horas a temperatura ambiente y luego con anticuerpo anti-digoxigenina en solución de bloqueo 1:5.000 durante una noche a 4°C.

Lavar con PBST reiteradas veces por dos horas y luego lavar tres veces con buffer AP 5' a temperatura ambiente.

Revelar incubando en oscuridad a temperatura ambiente en buffer de detección. Examinar los embriones con lupa de disección y frenar la reacción cuando se alcance la señal deseada lavando con PBST 1mM EDTA y fijar en 4% PFA durante una noche a 4°C. Lavar los embriones con PBST y luego con agua.

Para conservarlos, lavar con metanol dos veces y guardar a -20°C.

Soluciones:

PBST: PBS con 0,1% de Tween-20

SSC 20X: Para un litro pesar 175,3 g Citrato de Sodio, 88,2 g NaCl, llevar a volumen con H₂O. Ajustar a pH 7 con NaOH 10 N.

HYB⁺: 50% formamida, 5X SSC, 0,1%Tween-20, 50 ug/ml heparina y 1 mg/ml tRNA

Buffer AP: 100 mM Tris-HCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl y 0,1% Tween-20

Buffer de detección: Para 5 ml de AP agregar 11,25 ml de NBT(5-Bromo 4-Cloro 3-indolil-fosfato) (Roche) y 17,5 ml de BCIP (4-nitro blue tetrazolium chloride) (Roche)

g. Fotografías y procesamiento de imágenes

Las fotos fueron capturadas con cámaras digitales *Cool Snap* usando el programa *IPlab* (Scanalytics) y procesadas con *Adobe Photoshop* (Adobe Systems). Para las mediciones se utilizó la regla de navegación del programa *Adobe Photoshop* y para las cuantificaciones densitométricas se utilizó el programa *NIH image* (NHI).

Para tomar fotografías en tiempo real se utilizo un microscopio automatizado *Axioplam2* (Carl Zeiss). Los embriones fueron removidos manualmente de su corion, montados en un soporte de agar con solución E3, y fotografiados cada 5 minutos. Las fotografías individuales fueron procesadas con *Adobe Photoshop*, y las películas montadas con el programa *Open Lab* (Improvision).

II.6 Análisis bioinformático

a. Búsqueda y alineación de secuencias

Para la búsqueda de secuencias se utilizó el programa Blast [171]. Se analizaron las bases de datos del NCBI y del Ensembl. Para la alineación de secuencias se utilizó el programa ClustalX [172]

b. Análisis filogenéticos

La alineación de secuencias se realizó con el programa ClustalX [172]. Los árboles filogenéticos se construyeron usando un modelo de sustitución WAG con el programa PHYML [173]. La tasa de variación base por base fue modelada en una distribución gamma con cuatro categorías de tasas de sustitución y sitios invariables. El parámetro alpha y las proporciones de sitios invariables fueron estimados a partir de las secuencias.

III- Capítulo Primero

**Análisis de la estructura del gen de CHN2
y expresión de las distintas isoformas de
 β -chimaerin**

En la literatura está reportado que el gen CHN2 produce por procesamiento diferencial dos isoformas, $\beta 1$ y $\beta 2$ -chimaerin. Un análisis de las secuencias de los ARN mensajeros de $\beta 1$ y $\beta 2$ -chimaerin mostró que no comparten las secuencias 5' no codificantes, contradiciendo la idea del *splicing* alternativo. Existe además controversia en cuanto a la secuencia de $\beta 2$ -chimaerin, dado que se han reportado dos secuencias levemente distintas, Yuan et al. [52] reportaron una secuencia de aminoácidos distinta que la reportada por Leung et al. [174].

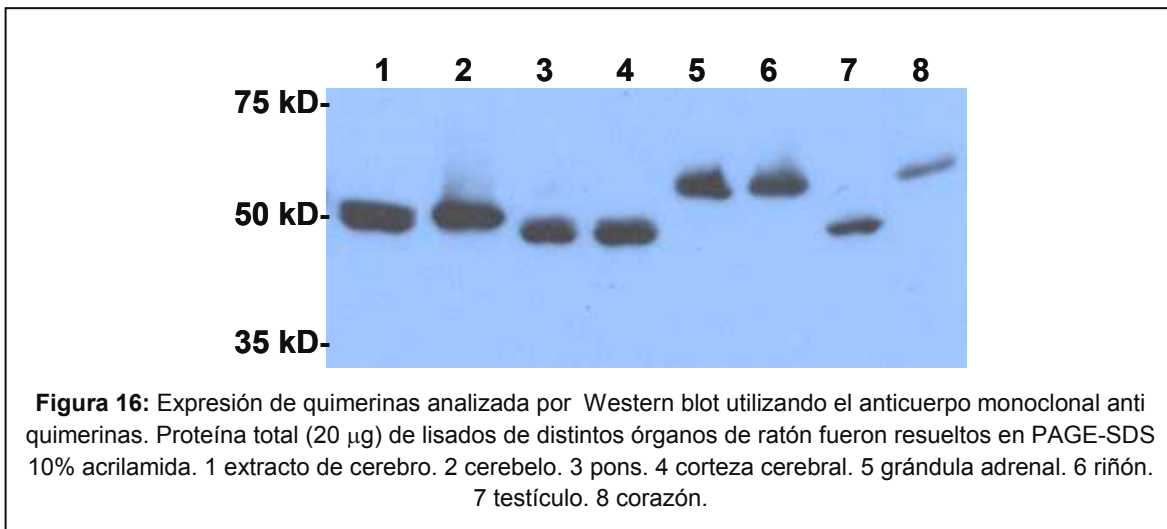
III.1 Objetivos

- Analizar la expresión de las quimerinas en distintos tejidos de ratón, y en distintas líneas celulares.
- Evaluar si las isoformas $\beta 1$ y $\beta 2$ -chimaerin se originan por *splicing* alternativo.
- Resolver la controversia de la secuencia de $\beta 2$ -chimaerin.

III.2 Resultados:

a. Expresión de distintas isoformas de quimerinas en tejidos de ratón

Con el objetivo de analizar la expresión de las quimerinas en tejidos de mamíferos, se diseccionó un ratón y se prepararon lisados de distintos órganos. Se obtuvieron muestras de cerebro total, cerebelo, pons, cortex, glándula adrenal, riñón, testículo y corazón. Se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-quimerina que reconoce el dominio de GAP de las quimerinas, por lo tanto es capaz de reconocer la cuatro isoformas descritas en mamíferos [38]. El resultado se muestra en la figura 16 y se puede ver la presencia de las distintas bandas correspondientes a quimerinas. La literatura reporta la existencia de dos genes, α y β (CHN1 y CHN2, respectivamente, según la nomenclatura de la base de datos del genoma humano) que, por procesamiento diferencial, dan cuatro isoformas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$). Las isoformas 2 poseen un dominio SH2 y tienen una masa molecular de 50 kD. Las isoformas 1 carecen del dominio SH2 y presentan una masa molecular de 35 kD. En humanos fueron clonadas las isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 2$, mientras que la isoforma $\beta 1$ no fue clonada aún. En la figura 16 se puede ver que existen en el ratón al menos tres isoformas de tamaños distintos, sin contar las isoformas 1 que no se lograron visualizar.



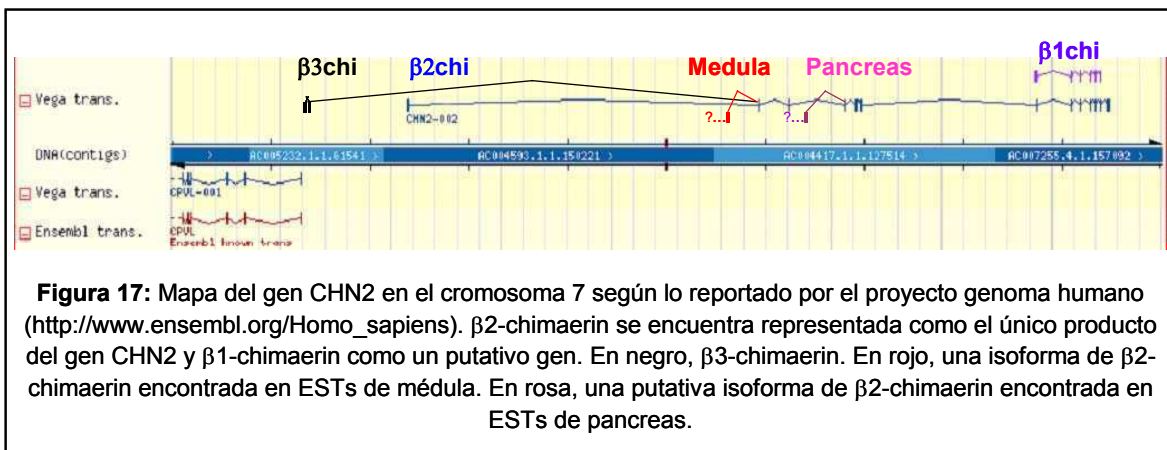
Sorprendentemente, se observó que en glándula adrenal, riñón y corazón existe una isoforma que posee un peso molecular de aproximadamente 60 kD. Por otro lado existen pequeñas diferencias de tamaño entre las quimerinas encontradas en cerebelo comparado con la encontrada en pons, cortex o testículo. Para explicar estas diferencias analizamos las distintas secuencias encontradas en bases de datos con herramientas de bioinformática.

Si bien el anticuerpo monoclonal reconoce a las isoformas α y β que tienen el mismo peso molecular, la presencia de bandas de distinto tamaño en el Western blot de la figura 16 se puede atribuir a la existencia de distintas variables de la isoformas β 2. Estas están reportadas como la misma proteína en las bases de datos, pero difieren en el extremo N-terminal. Según Yuan *et al.* [52] la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal sería MAASSNSSLS y la reportada por Leung *et al.* [174] MRLSSLS (ver anexo para secuencias completas). Si bien estos péptidos difieren en su secuencia y el primero es dos aminoácidos mas largo, esto no es suficiente para explicar las diferencias en la corrida electroforética. Sin embargo, un análisis de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) humanos comparándolos contra la secuencia del genoma humano sugiere la existencia de distintos mensajeros que codificarían para proteínas con extremos N-terminales distintos. Los ESTs, también conocidos como “*Single-pass cDNA Sequences*”, son secuencias correspondientes a ADN copia (cDNA) que se obtienen por secuenciación automatizada y al azar. Representan porciones de ARN mensajeros incompletas de no más de 700 pb [175]. Su utilidad es muy variada, y se encuentran disponibles en las bases de datos cada día más secuencias de distintos tejidos y especies. Haciendo una búsqueda de secuencias relacionadas a la de β 2-chimaerin utilizando el programa BLAST en las bases de datos de ESTs humanos del NCBI se encontraron distintas secuencias correspondientes a ARN mensajeros que compartían secuencias con β 2-chimaerin y que diferían en sus extremos 5'. Estas secuencias fueron traducidas en el marco de lectura correcto utilizando el código genético y se vio que algunas de ellas no correspondían a mensajeros que pudieran dar lugar a proteínas por la presencia de codones “*stop*”. Tres secuencias llamaron nuestra atención, por codificar para extremos N-terminales distintos.

Una de estas variantes encontrada en un EST de tumor de riñón humano, presenta un N-terminal considerablemente mayor, aunque está incompleto. Se identificaron dos exones 48 kb río arriba del inicio de la transcripción de β 2-chimaerin que codifican para 80

aminoácidos novedosos en la porción N-terminal (aproximadamente 9 kD). Esto representaría un nuevo dominio, que al estar incompleto no podemos predecir (Figura 18). Esta isoforma a la cual llamamos β 3-chimaerin explica la presencia de una proteína de aproximadamente 60 kD en riñón, glándula adrenal y corazón como se vio en el gel de la figura 16. Estos intrones se encuentran 50 kb río arriba del comienzo de la transcripción de β 2-chimaerin, con lo cual podemos decir que β 3-chimaerin no se originaría por procesamiento diferencial, sino por inicio de la transcripción diferencial. Otras tres secuencias muestran que existe, en distintos tejidos, una variedad de mensajeros para β 2-chimaerin, que podrían ser los responsables de las diferencias observadas en la corrida electroforética de la figura 16.

Analizando la secuencia genómica del gen CHN2 (el que codifica para las isoformas beta) en el cromosoma 7, se puede ver que presenta dos intrones muy grandes (el 1 y el 6) de 160 kb y 80 kb, respectivamente (Figura 17). Tomando como referencia la secuencia de nucleótidos que codifica para la isoforma β 1-chimaerin de ratón, se clonó *in silico* β 1-chimaerin humana (anexo). Esta isoforma tiene su comienzo de transcripción en secuencias dentro del intrón 6. Si bien no se conocen las secuencias promotoras, esto indica que la isoforma 1 no se produce por procesamiento diferencial, sino que tiene su inicio de la transcripción en el intrón 6.



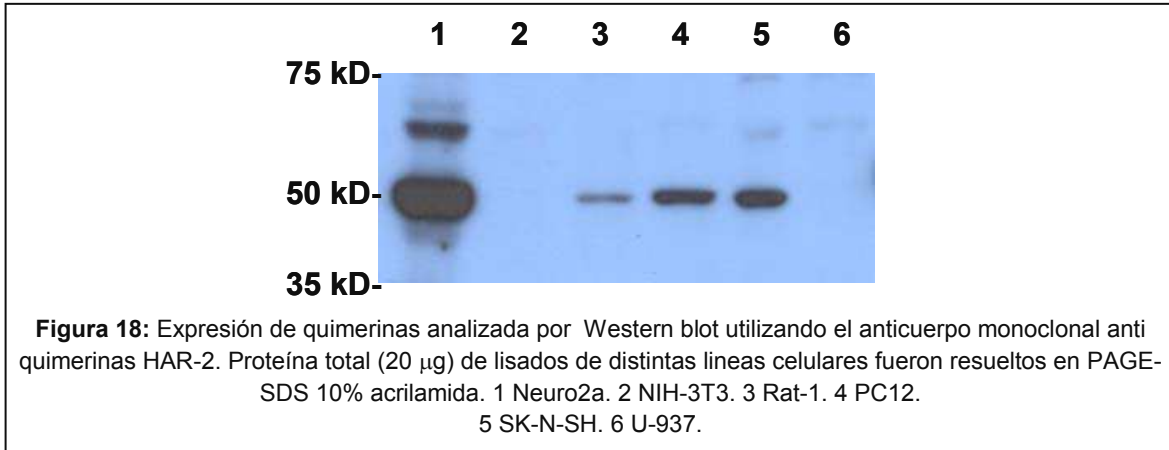
Comparando la secuencia genómica con la de los ESTs se pueden predecir dos nuevas isoformas. Estas pueden ser producto de inicios de la transcripción alternativos como $\beta 1$ y $\beta 3$ o productos de procesamiento diferencial, ya que no se encontraron las secuencias del extremo 5' del mensajero. Estas isoformas encontradas en páncreas y médula varían en los primeros 10-20 aminoácidos de $\beta 2$ -chimaerin, conservando su masa molecular de aproximadamente 50 kD. Estas variantes de $\beta 2$ -chimaerin explicarían las leves diferencias en la corrida electroforética entre las quimerinas encontradas en cerebelo y pons por ejemplo.

Un análisis de los 5' no codificante de las secuencias clonada por Leung *et al.* y Yuan *et al.* comparándolos con la secuencia del genoma humano, muestra que la clonada por Yuan *et al.* se corresponde con la secuencia codificada en el cromosoma 7. La secuencia reportada por Leung *et al.* y clonada de forma independiente en nuestro laboratorio a partir de ADN copia de cerebelo humano [38] presenta el 5' no codificante y la secuencia que codifica para los 4 primeros aminoácidos completamente distinta a la anterior. El alineamiento de esta secuencia contra el genoma nos revela que esta codificada en el cromosoma 17. Si bien este dato es preliminar, la secuencia fue reportada y clonada por PCR dos veces en laboratorios distintos. Esto no excluye la posibilidad de que se trate de una translocación cromosómica, aunque la probabilidad de que haya ocurrido en dos ocasiones en el mismo sitio es muy baja. A la luz de estos resultados, podríamos postular que estamos frente a un caso de “*trans-splicing*”, un evento muy común en tripanosomas pero muy poco frecuente en mamíferos [176].

b. Expresión de quimerinas en distintas líneas celulares

Se analizó por Western blot la expresión de quimerinas en distintas líneas celulares usadas en el laboratorio. Para ello se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-quimerinas. En la figura 18 se puede ver que la línea de neuroblastoma de ratón Neuro2a expresa niveles muy altos de estas proteínas. A su vez los fibroblastos de rata Rat-1, las células derivadas de feocromocitoma adrenal de rata PC-12 y las células derivadas de un neuroblastoma humano con metástasis en médula ósea SK-N-SH también las expresan aunque con niveles menores. Los fibroblastos de ratón NIH-3T3 y las células derivadas de linfoma histiocítico humano, U-937 no expresan niveles apreciables de quimerinas. En las células Neuro2a se detectó

además una isoforma de aproximadamente 60 kDa que podría corresponderse con β -chimaerin descrita anteriormente.

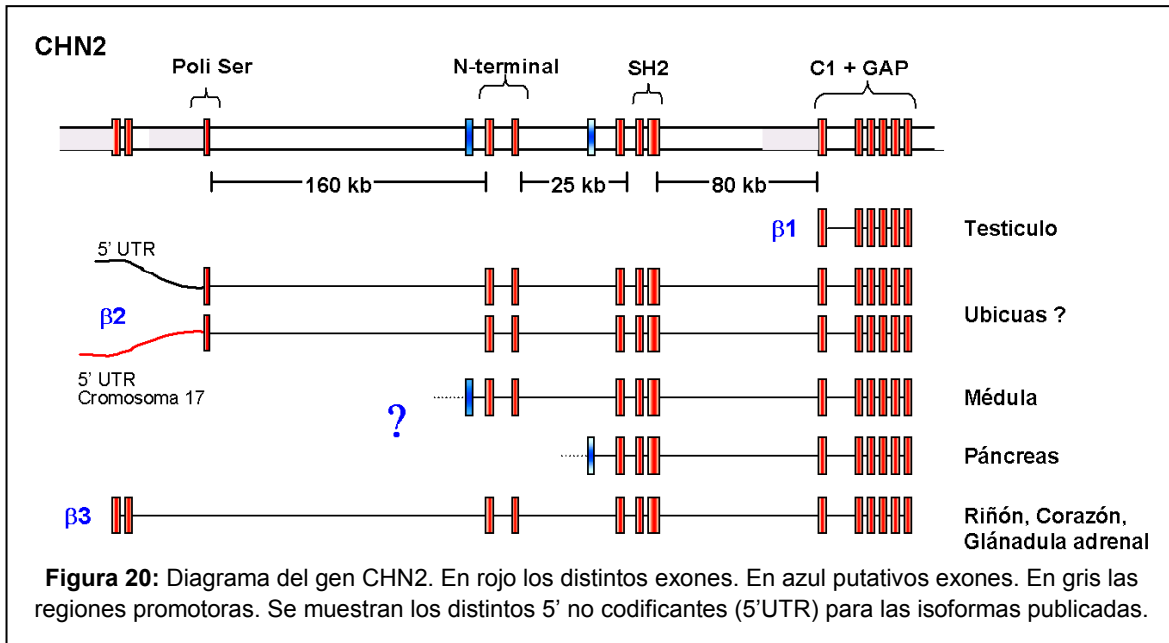


III.3 Conclusiones

Nuestro análisis sugiere la existencia de al menos tres nuevas isoformas de quimerinas, además de las dos isoformas conocidas $\beta 1$ y $\beta 2$, codificadas por el gen CHN2. Una de estas isoformas encontrada en ESTs de tumor de riñón explica la presencia de las bandas de 60 kD en lisados de riñón, corazón y glándula adrenal. Esta isoforma, que llamamos $\beta 3$ -chimaerin, tiene su sitio de inicio de la transcripción 50 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de $\beta 2$ -chimaerin. Este hecho afirma que $\beta 3$ -chimaerin y $\beta 2$ -chimaerin no son variantes por procesamiento diferencial, sino que se originan por sitios de inicio de la transcripción diferenciales. Esto es cierto también para $\beta 1$ -chimaerin, que se reporta en la literatura hasta la fecha como el producto del procesamiento diferencial del mensajero de $\beta 2$ -chimaerin. Hemos clonado *in silico* la secuencia codificante para $\beta 1$ -chimaerin. El mensajero que codifica para esta isoforma tiene su comienzo de la transcripción en el intrón 7 del gen CHN2, indicando que no es producto del *splicing* alternativo sino que tiene un sitio de inicio de la transcripción diferencial. Existen al menos otras dos isoformas encontradas en la médula oblongata y páncreas cuyos orígenes de la transcripción no se conocen, y que dan lugar a proteínas de tamaño molecular muy similar a $\beta 2$ -chimaerin. Estas isoformas podrían ser originadas tanto por procesamiento diferencial como por inicios de la transcripción alternativos.

La figura 19 explica de modo gráfico las distintas proteínas codificadas por el gen CHN2. El clonado y caracterización de estas nuevas isoformas no será objeto de estudio de esta tesis, pero es importante recalcar el descubrimiento de nuevas isoformas tejido específicas para el gen β que pueden originarse ya sea por procesamiento diferencial, como fuera asumido en los trabajos publicados hasta la fecha, o por la existencia de distintos inicios de la transcripción, como sugieren los ESTs analizados previamente. Más adelante se profundizará en el papel del extremo N-terminal en la regulación de la actividad de $\beta 2$ -chimaerin. A los fines de este trabajo, llamaremos $\beta 2$ -chimaerin a la isoforma clonada originalmente por Leung *et al.* [174], que es idéntica a la clonada por nuestro laboratorio [38] (anexo).

separados de los anteriores por 80 kb. Es en este intrón donde se encuentran la zona promotora de $\beta 1$ -chimaerin y el inicio de la transcripción de su mensajero. El exón 1 de $\beta 1$ -chimaerin comienza en el intrón 6 e incluye en su extremo 3' al exón 7 de $\beta 2$ -chimaerin. Es en el exón 7 donde comienza la secuencia que codifica para el dominio C1 [5]. A partir del exón 8 los transcritos se procesan igual en todas las isoformas.



IV- Capítulo Segundo

**Análisis del mecanismo de activación por
lípidos de β 2-chimaerin e identificación de
mutantes hiper-activas**

A los efectos de entender la estructura, regulación y función de las quimerinas, se estableció una colaboración con el laboratorio del Dr. James Hurley en los Institutos Nacionales de Salud (NIH, Bethesda, MD, USA) con el objetivo de resolver la estructura cristalográfica de β 2-chimaerin. El Dr. Hurley fue quien resolvió la estructura cristalográfica del dominio C1 en complejo con ésteres forbol [6]. Esta colaboración no sólo nos permitió conocer la estructura de β 2-chimaerin, resolviendo por primera vez la estructura cristalográfica de un dominio C1 en el contexto de una proteína completa, sino que también nos ayudó a entender el mecanismo de activación por el segundo mensajero DAG y la interacción con fosfolípidos de membrana.

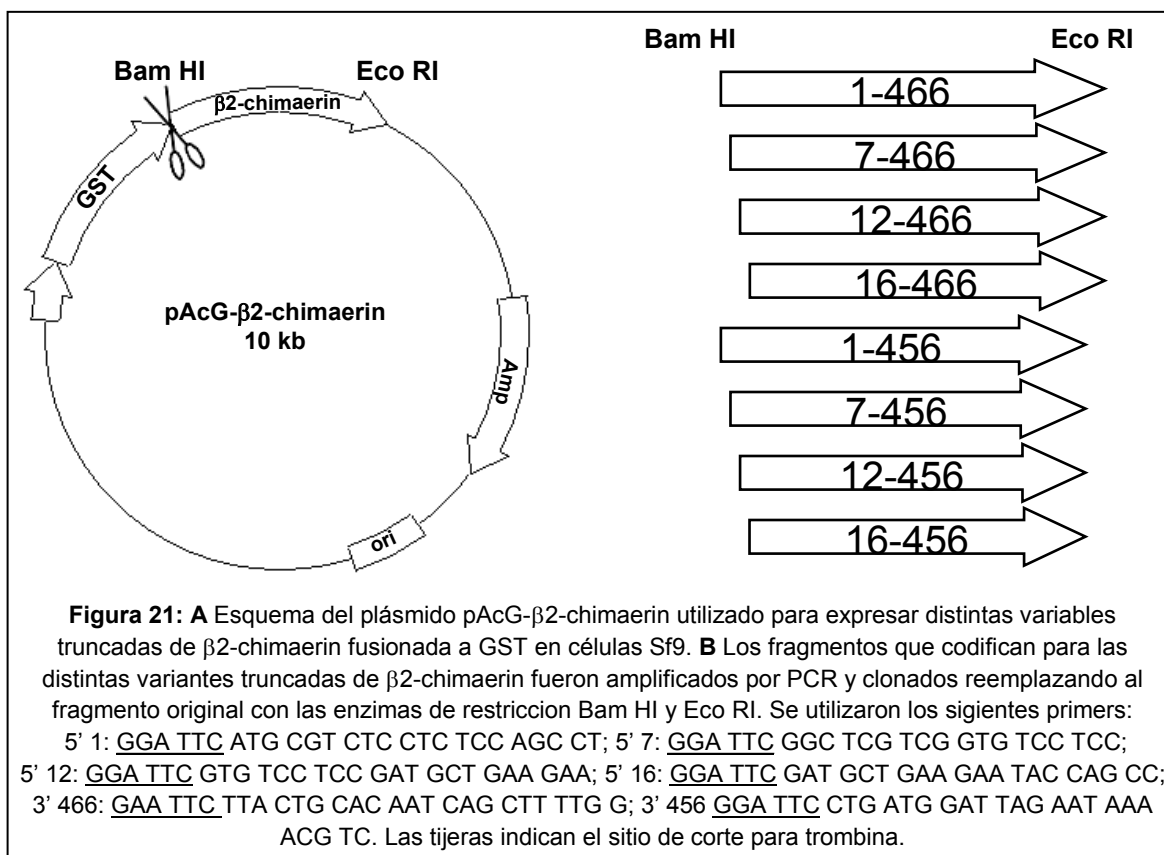
IV.1 Objetivos

- Clonar la secuencia de β 2-chimaerin en el vector pAcG2T para su producción en células de insectos.
- Analizando la estructura cristalográfica, proponer un modelo para su activación por lípidos.
- Generar mutantes sensibilizadas al DAG y los ésteres de forbol e hiper-activas en su función de GAPs.

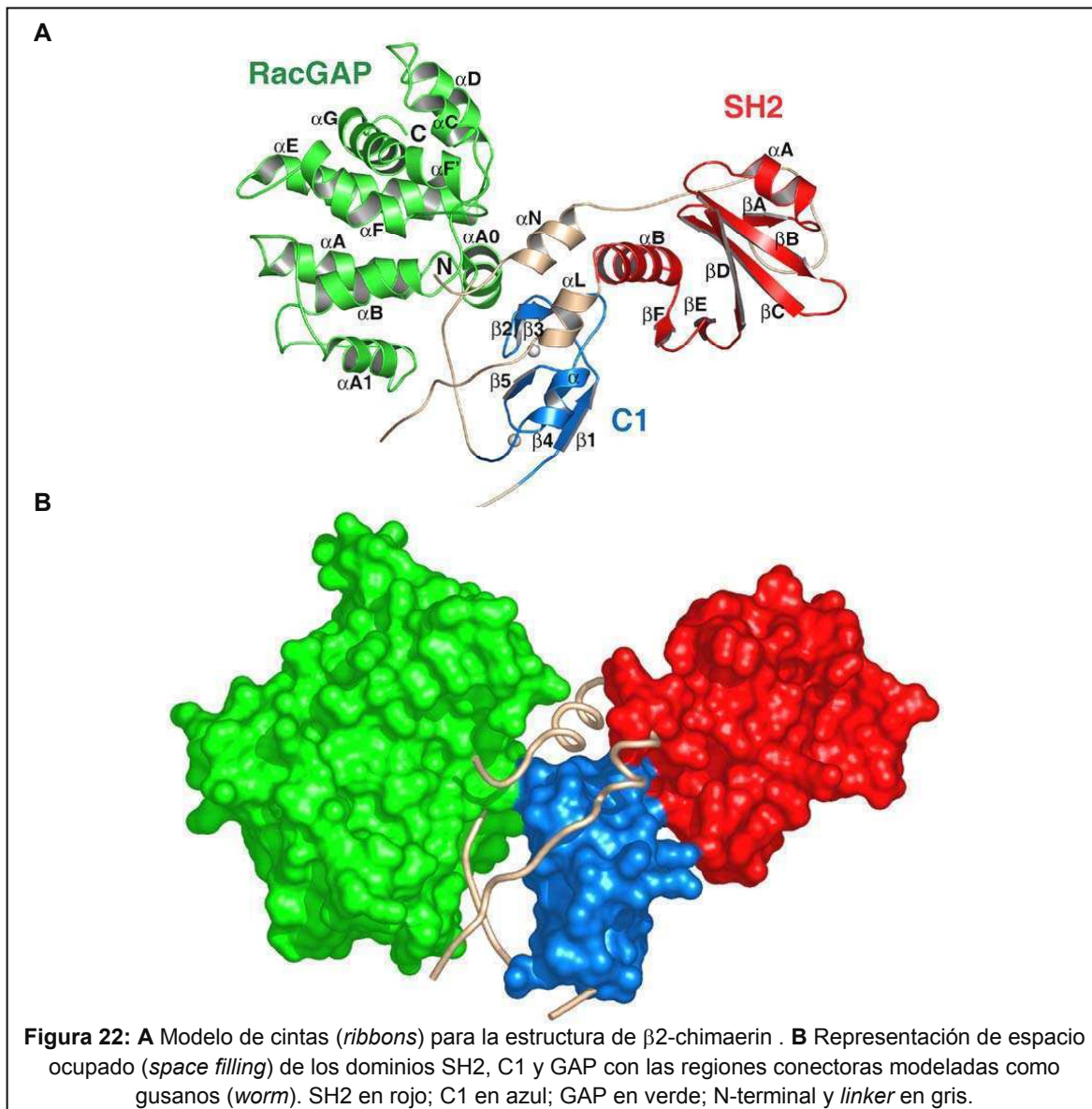
IV.2 Resultados:

a. Resolución de la estructura cristalográfica de $\beta 2$ -chimaerin

En el laboratorio del Dr. James Hurley (NIH, Bethesda, MD, USA), se resolvió la estructura cristalográfica por difracción de rayos X de $\beta 2$ -chimaerin a 3.2 Å de resolución [177]. Para producir y purificar proteína recombinante se utilizó el sistema de expresión a través de infección báculo-viral en células de insectos Sf9, donde la proteína recombinante se expresa fusionada a GST. Dado que $\beta 2$ -chimaerin es una proteína multidominio no fue fácil la obtención de cristales homogéneos. Debido a que los extremos amino y carboxilo terminales no forman parte de ningún dominio, podrían estar poco ordenados y ocasionar “ruido” en la difracción. Para evitar esto, se clonaron distintas variables truncadas en el extremo amino y carboxilo terminal partiendo del plásmido pAcG- $\beta 2$ -chimaerin [38] como se muestra en la figura 21.



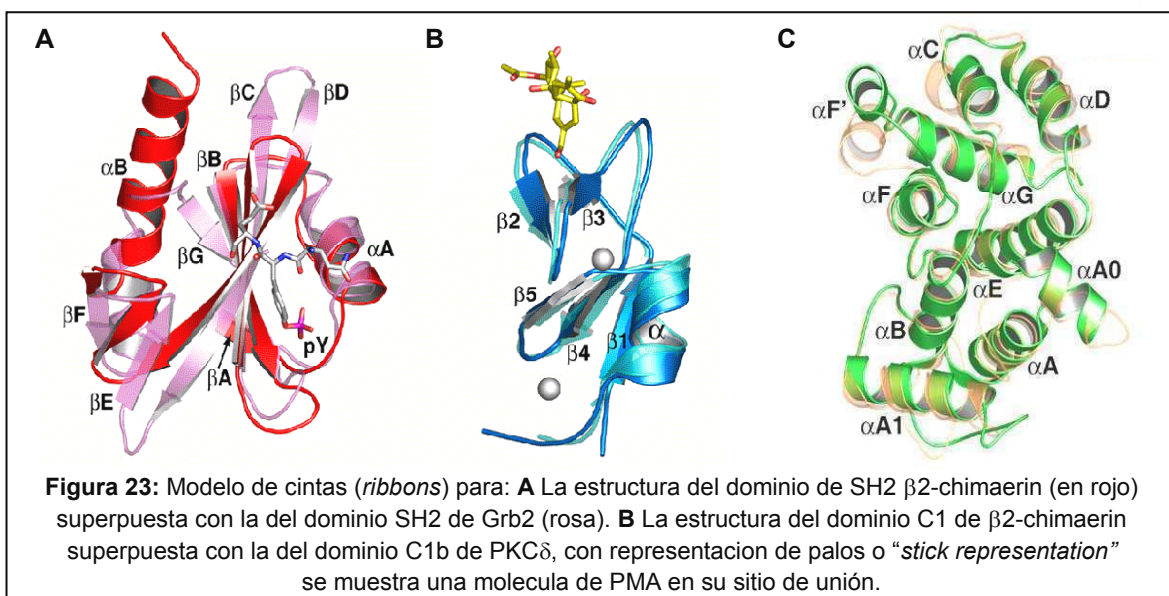
Finalmente se obtuvieron cristales homogéneos a partir de la proteína con la secuencia completa producida con la construcción original pAcG- β 2-chimaerin [38], y se pudo resolver la estructura cristalográfica a 3.2 Å de resolución. La figura 22A muestra el modelo para la estructura de β 2-chimaerin, con los dominios SH2 en rojo, C1 en azul, y GAP en verde, y las regiones N-terminal y la región conectora o *linker* en gris. La figura 22B muestra una representación de espacio ocupado o “*space filling*” orientada y coloreada como en A con las regiones “*linker*” mostradas en una representación tipo gusano o “*worm representation*”.



La estructura del dominio SH2 fue superpuesta con la del dominio de Grb2, como se muestra en la figura 23A. Estos dominios presentan una rmsd (*Root Mean Square Deviations*) de 1.5 Å y la mayor diferencia entre ambas estructuras se observa en la hélice α B en el extremo N-terminal del dominio SH2. Esta α hélice presenta cinco giros en vez de los tres observados en la de Grb2, y está en una orientación diferente. Otra diferencia entre estos dominios es que no posee la lámina terminal β G. Este dominio SH2 se asemeja al de la proteína adaptadora APS que carece de β G y presenta una α B más larga.

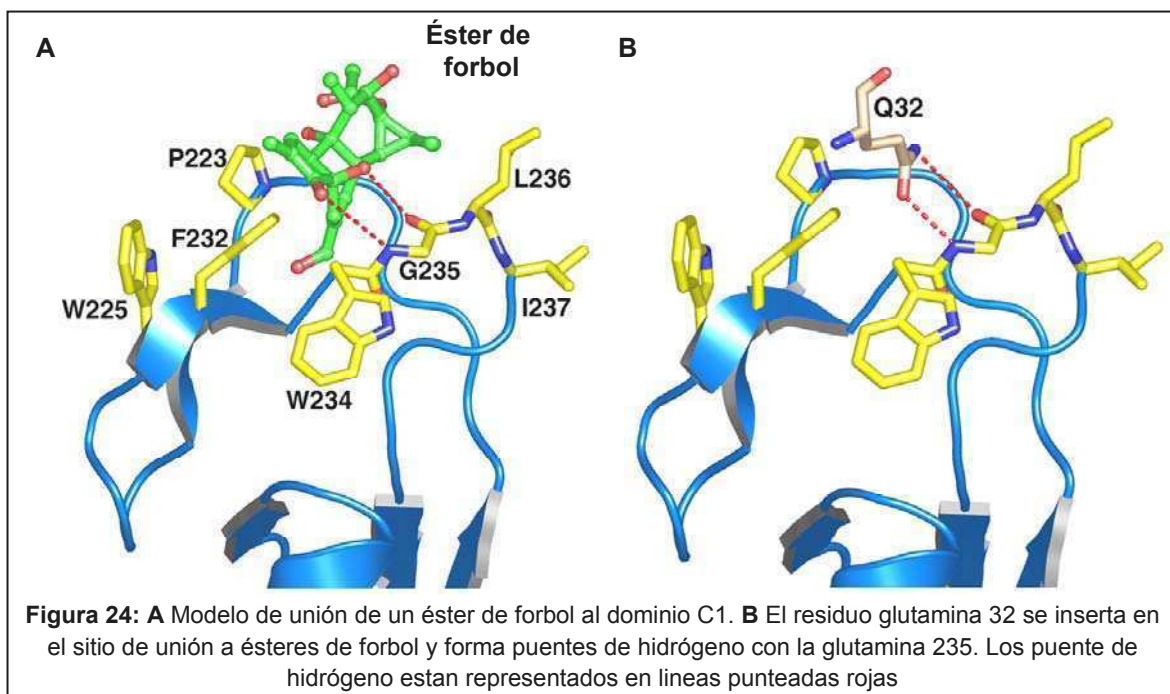
La estructura del dominio C1 presenta una gran similitud con el dominio C1b de PKC δ . Estos fueron superpuestos mostrando una rmsd de 0.8 Å (Figura 3 B). Este dominio hace contacto con el extremo N-terminal, los dominios SH2 y GAP, y las regiones “*linker*” que unen los tres dominios. El dominio aislado posee una superficie de contacto con el solvente de 4056 Å² de los cuales sólo 2481 Å² se encuentran expuestos al solvente en la proteína intacta. Los putativos residuos hidrofóbicos de unión a membrana se encuentran “enterrados” por contactos intermoleculares con el resto de la proteína.

La estructura del dominio de Rac-GAP es homóloga a la de los dominios de Rho-GAP previamente cristalizados, como cabe esperar debido a su similitud de secuencias. Este dominio puede ser superpuesto con el dominio de Rho-GAP de p50RhoGAP mostrando un rmsd de 1.2 Å. En la figura 23C se ve la estructura del dominio de Rac-GAP superpuesto con el dominio de Rho-GAP de p150RhoGAP.



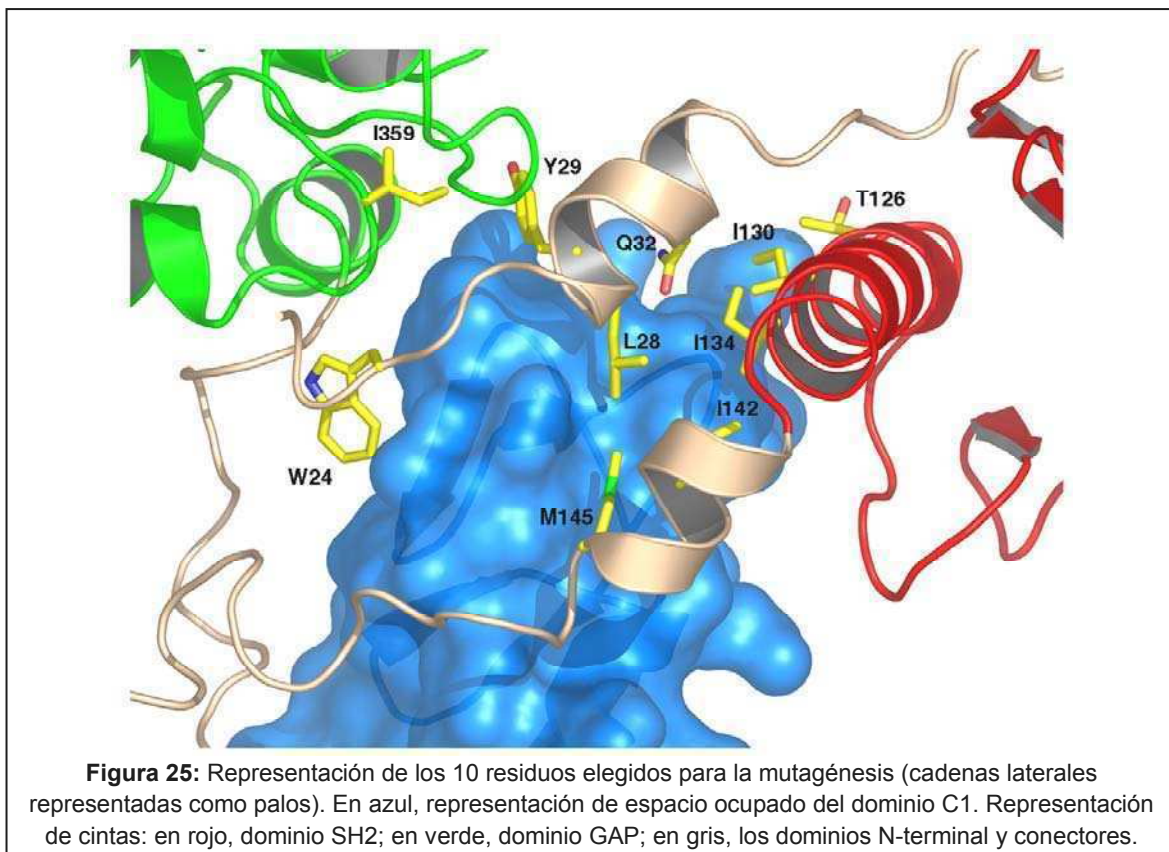
El extremo N-terminal de β 2-chimaerin se encuentra ordenado entre los aminoácidos 21 y 54. Este segmento mide 60 Å, extendiéndose prácticamente el largo completo de la proteína. Los aminoácidos 21 a 24 están en contacto con el dominio de Rac-GAP. El segmento 27-34 forma un α hélice (α N) que hace contacto con el sitio de unión a membrana, cubriendo el sitio de unión a DAG y ésteres de forbol del dominio C1. La glutamina en posición 32 protruye de la hélice insertándose en el sitio de unión a ésteres de forbol formando uniones puente de hidrógeno con la glutamina 235 (Figura 24). El resto de los residuos (aminoácidos 35 a 54) forman un lazo o “loop” de unión al dominio SH2.

Los primeros 25 residuos de la secuencia que une el dominio SH2 con el dominio C1 (139 a 147) se encuentran ordenados, formando una α hélice (α L por *linker*). Esta hélice descansa sobre el dominio C1 haciendo contacto de forma antiparalela con α N.



b. Análisis por mutación de la unión a ésteres de forbol de $\beta 2$ -chimaerin

Como se dijo en la introducción, si bien $\beta 2$ -chimaerin une ésteres de forbol *in vitro* a concentraciones similares que las PKCs, en células requiere concentraciones 100 veces mayores para translocarse a la fracción de membranas en respuesta a PMA. De la estructura cristalográfica podemos hipotetizar que esta diferencia se debe a que el dominio C1 se encuentra “enterrado” en la estructura terciaria con interacciones intermoleculares con los distintos dominios y con αN y αL . El sitio de unión a ésteres de forbol y DAG se encuentra ocluido por la glutamina en posición 32 (Figura 25). En el caso de los ensayos *in vitro* la unión se hace en presencia de vesículas fosfolípídicas de fosfatidilserina y fosfatidilcolina [1, 38]. En estas condiciones donde los lípidos están en exceso, la estructura terciaria estaría abierta y el dominio C1 expuesto permitiendo la unión del éster de forbol con alta afinidad.



respuesta a PMA en células de PKC α y de la isoforma β 1-chimaerin que carece del dominio SH2, y N-terminal y por lo tanto el dominio C1 no estaría impedido estéricamente. En la figura 7 se muestra la respuesta a distintas concentraciones de PMA de β 2-chimaerin wt y sus distintas mutantes, de β 1-chimaerin y de PKC α . Los experimentos de fraccionamiento fueron repetidos al menos 3 veces, y un máximo de 7 veces. Se analizó por Western blot la cantidad de proteína en las fracciones total, soluble e insoluble y se cuantificaron las fracciones solubles. En todos los casos las fracciones totales no variaron después del tratamiento con PMA. Los datos de las cuantificaciones de la fracción soluble se graficaron como porcentaje de proteína soluble respecto del control (sin PMA) contra logaritmo en base diez de la concentración de PMA expresada en nanomolar. Estos datos se ajustaron por regresión lineal a una curva de sigmoidea del tipo dosis-respuesta y se calculó la EC₅₀ (concentración de agonista necesaria para que se produzca el 50% del efecto máximo) para cada una utilizando el programa Prism 3.0 (Figura 26). En todos los casos el R² fue mayor a 0.9 salvo en la mutante C246A que no responde a PMA. Los valores de los EC₅₀ y los R² se muestran en la Tabla 3.

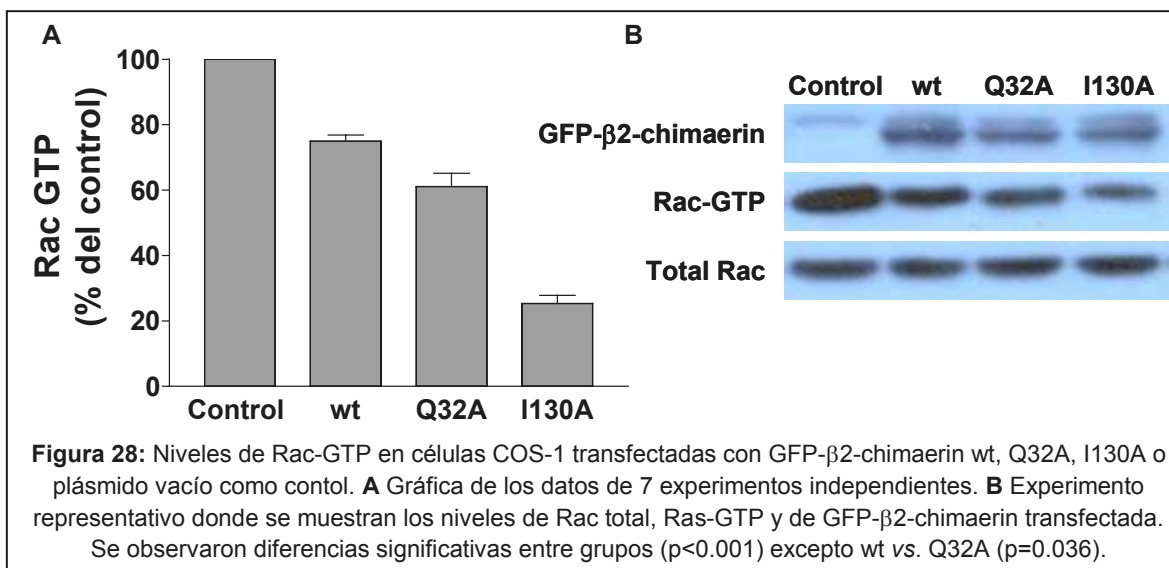
Tabla 3:

	WT	W24A	L28A	Y29A	Q32A	T126A	I130A	I134A	I142A	1445A	I359A	β 1-	PKC α
EC ₅₀	1193 ± 33	20.7 ± 3.2	14.7 ± 2.5	58.5 ± 3.6	86.9 ± 6.1	4902 ± 342	15.5 ± 1.2	50.8 ± 5.7	54.1 ± 5.0	66.2 ± 8.1	45.6 ± 5.3	20.2 ± 0.9	10.2 ± 0.4
R ²	0.96	0.95	0.96	0.98	0.95	0.91	0.93	0.94	0.95	0.94	0.95	0.98	0.98

Las mutantes hipersensibles al PMA se llamaron SUPER-chimaerins (*por Single-Mutant Ultrasensitive Phorbol Ester Responsive Chimaerins*).

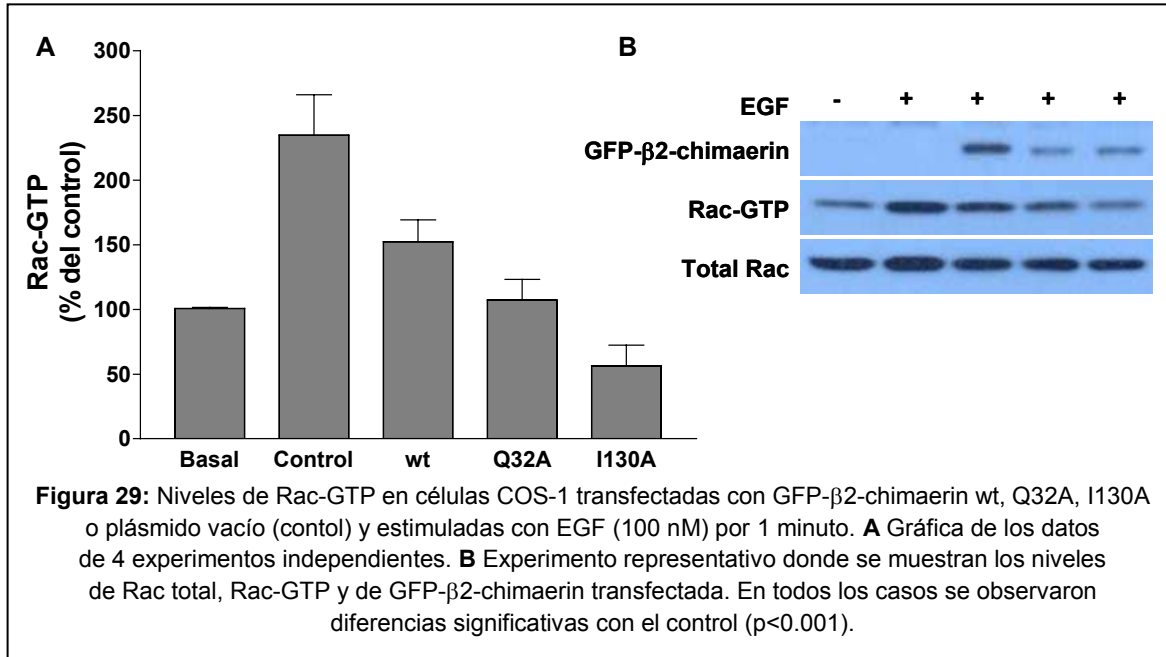
c. Análisis de la actividad de Rac-GAP de las SUPER-chimaerins

Con el objeto de estudiar la actividad biológica de las SUPER-chimaerins, se midió el estado de activación de Rac como forma indirecta de medir la actividad de GAP. Para ello, células COS-1 fueron transfectadas con pEGFP- β 2-chimaerin wt, Q32A, I130A o plásmido vacío (GFP) como control y 48 horas más tarde los niveles de Rac GTP fueron medidos mediante el ensayo de precipitación con GST-PBD (por *p21 Binding Domain*) como se describió en métodos. El dominio PBD de Pak se une específicamente a Rac y Cdc42 en estado activo (unido a GTP), y utilizando un anticuerpo específico contra Rac se pueden medir los niveles de Rac totales y GTP (precipitado con GST-PBD). En un primer experimento se midieron los niveles de Rac-GTP en células creciendo en medio con suero (10% FBS). Los resultados se muestran en la figura 28.



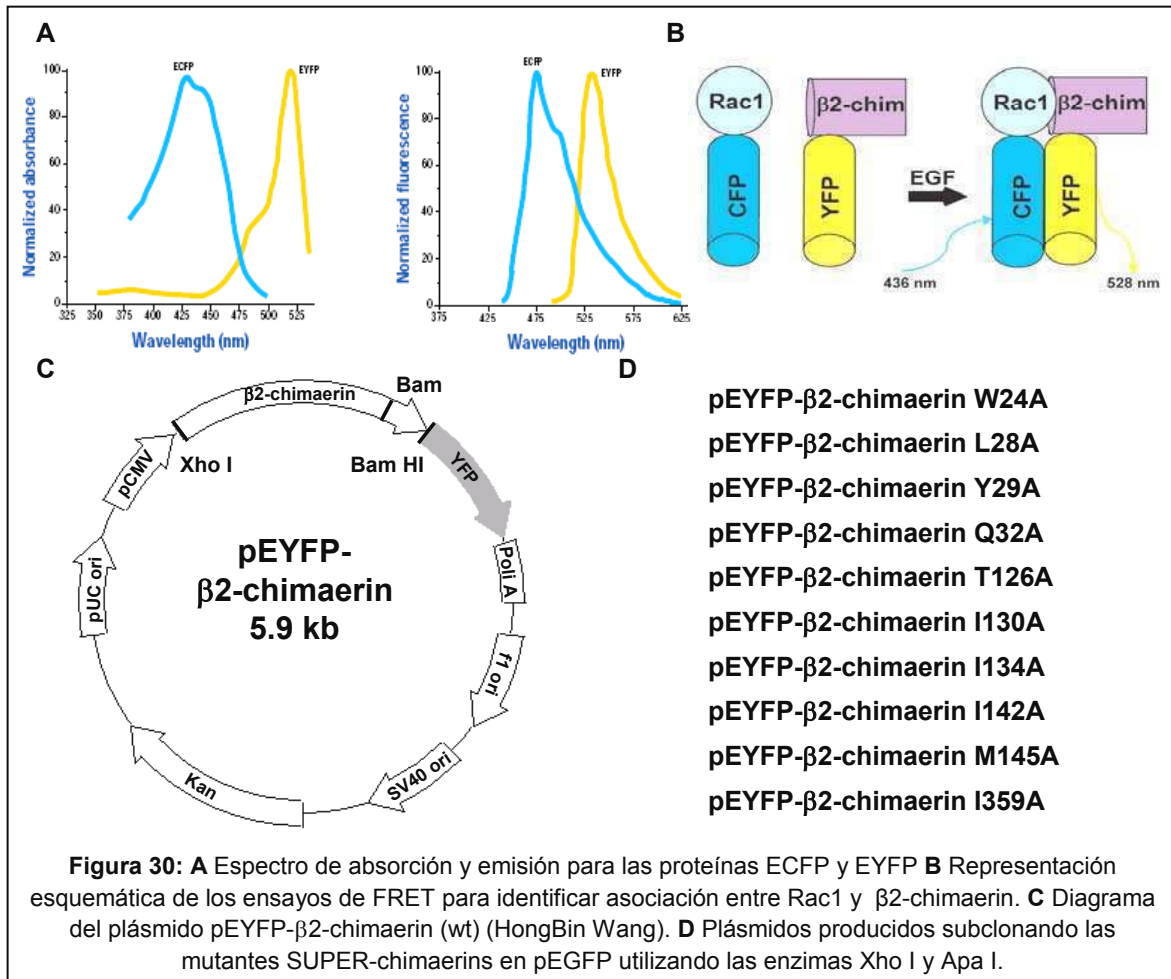
Dado que el ligando natural de β 2-chimaerin es el DAG, y éste es producido por la fosfolipasa C cuando se activa el receptor de EGR (EGFR), y que Rac se encuentra río abajo de este receptor, investigamos el efecto de las SUPER-chimaerins sobre la señalización de EGFR a través de Rac. Para ello se midieron los niveles de Rac-GTP en COS-1 transfectadas con pEGFP- β 2-chimaren wt, Q32A, I130A o plásmido vacío (GFP) como control. Veinticuatro horas más tarde se removió el suero del medio y se incubaron las células en medio mínimo por 16 horas. Los niveles de Rac-GTP fueron medidos mediante el

ensayo de precipitación con GST-PBD tras estimular las células con EGF por 1 minuto. El resultado se muestra en la figura 29.



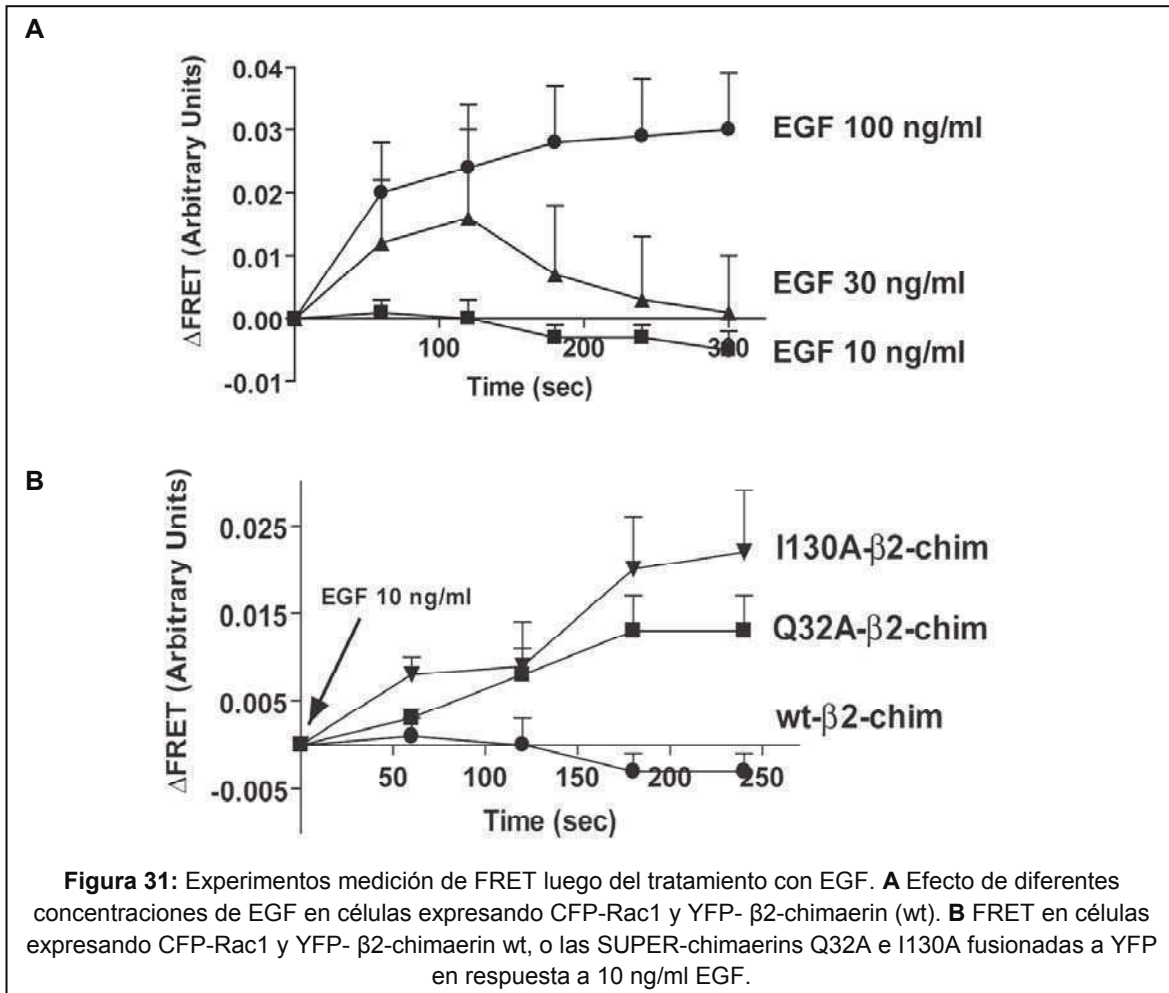
Para medir la actividad de las SUPER-chimaerins en un sistema celular intacto, se recurrió a la utilización de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) para detectar la interacción entre Rac1 y β2-chimaerin. Este sistema fue desarrollado en nuestro laboratorio por HongBin Wang, y consiste en la utilización de dos proteínas de fusión fluorescentes. Una de ellas, CFP (*Cyan Fluorescence Protein*), fluoresce cuando es excitada con luz de longitudes de onda entre 400 y 450 nm emitiendo luz con un pico a los 475 nm. Por otra parte, la proteína YFP (*Yellow Fluorescence Protein*) tiene su pico de absorbancia aproximadamente a los 525 nm, emitiendo luz con un pico de 550 nm. Cuando estas proteínas se encuentran muy próximas entre si y se las excita con luz de longitud de onda de 425 nm, se produce el fenómeno de transferencia de energía desde CFP hacia YFP, emitiendo fluorescencia a 550 nm (Figura 30). Si se fusiona CFP a Rac-1 y YFP a β2-chimaerin, se puede ver que hay un cambio en los niveles de transferencia de energía en la membrana al estimular un receptor de membrana (Figura 31) o al tratar las células con PMA (dato no mostrado).

Se subclonaron las SUPER-chimaerins en el vector pEYFP (Clontech). Para ello se utilizó el plásmido pEYFP- β 2-chimaerin (HongBin Wang sin publicar, Figura 31), aprovechando un sitio de corte interno para la enzima Apa I y el sitio Xho I del vector, reemplazando la secuencia que codifica para β 2-chimaerin por la de las SUPER-chimaerins.



Los experimentos de FRET mostraron que la asociación de β 2-chimaerin con Rac1 es dependiente de la producción de DAG por PLC [178]. Como se puede ver en la figura 31 las SUPER-chimaerin son capaces de interactuar con Rac1 a concentraciones de EGF que no causan efecto en la proteína tipo salvaje (wt). Estos resultados apoyan nuestro modelo de activación de β 2-chimaerin por lípidos, siendo las SUPER-chimaerin más activas y más

sensibles al DAG y los ésteres de forbol por el hecho de tener desestabilizada la estructura terciaria, favoreciendo la estructura “abierta” donde el domino C1 se encuentra accesible.



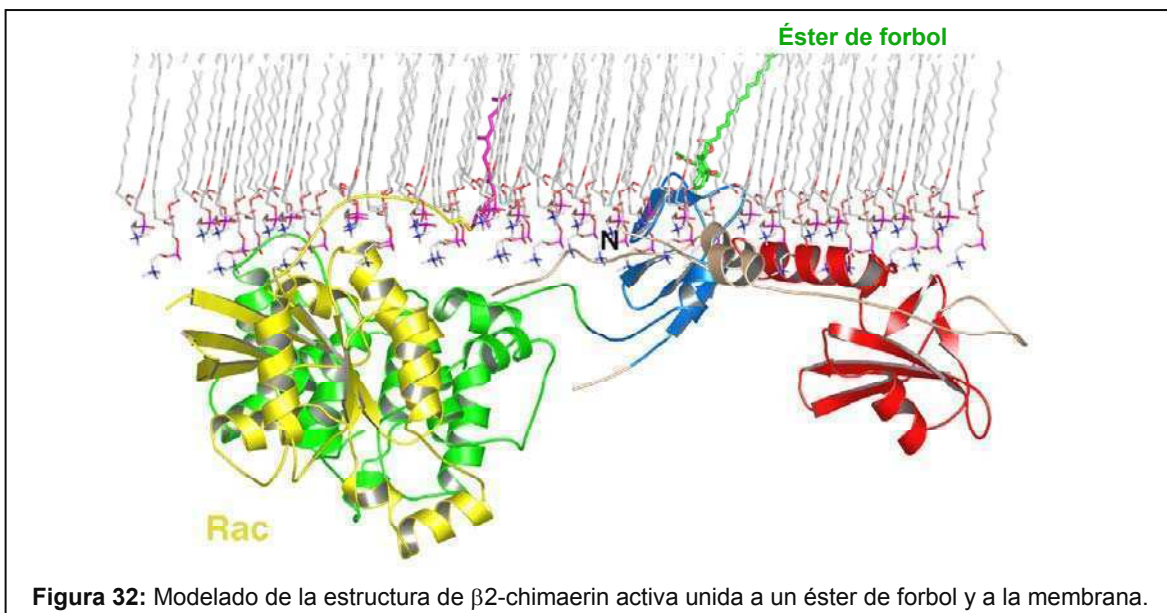
IV.3 Conclusiones

Las proteínas que responden a DAG se translocan del citoplasma a la membrana plasmática en respuesta a la producción de este segundo mensajero y al tratamiento con ésteres de forbol. Esta translocación es mediada por el dominio C1, quien penetra en la membrana tras la interacción con DAG o ésteres de forbol. Hay evidencias de que las zonas hidrofóbicas que rodean al sitio de unión de DAG se insertan en la membrana, y estos residuos son críticos para la unión de ésteres de forbol [5]. En β 2-chimaerin el 40 % de la superficie del dominio C1 y todo el presunto sitio de inserción a membrana está impedido estéricamente con contactos intramoleculares con el resto de la molécula. La glicina en posición 235 debería interactuar con los grupos hidroxilos 3- y 4- de los ésteres de forbol al igual que su homóloga S253 en las PKCs. La glicina 32 de β 2-chimaerin se encuentra bloqueando este sitio de unión a ésteres de forbol, haciendo que la estructura sea incompatible con la unión de ésteres de forbol y fosfolípidos de membrana. Cuatro diferentes regiones están en contacto con el dominio C1: el dominio SH2, el dominio de GAP, la alfa hélice N-terminal (α -N) y la alfa hélice conectora entre el dominio SH2 y C1 (α -L por *Linker*). Estas interacciones cubren la zona de inserción a membrana del dominio C1, y cada uno de estos dominios está involucrado en interacciones con las cadenas laterales hidrofóbicas. La energía necesaria para romper estas interacciones explica la necesidad de altas dosis de PMA para lograr la translocación de β 2-chimaerin en comparación con la isoforma β 1-chimaerin que carece de los dominios SH2, α -N y α -L o con PKC α .

Utilizando mutagénesis dirigida, se desarrollaron 10 mutantes de residuos internos. Estos residuos fueron elegidos para desestabilizar la estructura secundaria, disminuyendo la energía libre requerida para alcanzar el estado “abierto” o activo. Los residuos elegidos para la mutación se ubican en la α -N, α -L y en las zonas del dominio SH2 y GAP que hacen contacto con el C1. Todas las mutantes menos una mostraron ser más sensible a la translocación por el éster de forbol PMA. La mutante triptofano 24 por alanina (W24A), leucina 28 por alanina (L28A) y isoleucina 130 por alanina (I130A), son tan sensibles al PMA como las PKCs y β 1-chimaerin. El W24 se encuentra enterrado entre el dominio C1 y el dominio de GAP, el L28 lo hace entre α L y el dominio C1, mientras que I130 está

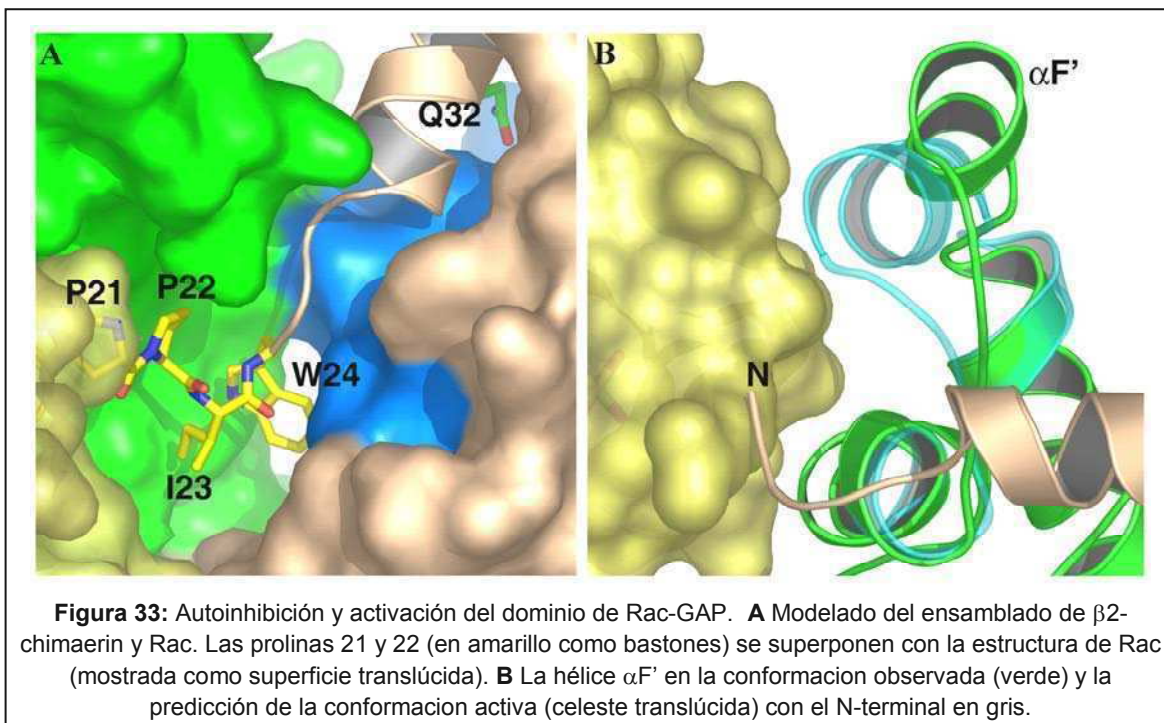
enterrado en la interfase $\alpha N/C1$. Estos aminoácidos median contactos entre más de un interdominio provocando mayores aumentos en la sensibilidad al PMA al mutarlos. La mutante treonina-126-alanina (T126A), en cambio, produce un efecto opuesto al resto. El aminoácido T126 está en contacto con la leucina 236 del dominio C1. Este contacto parecería empujar a la L236 hacia una conformación desfavorable. La mutante T126A alivia esta tensión estérica, estabilizando la conformación cerrada aún más.

Estos resultados implican que interacciones intramoleculares deben romperse para que $\beta 2$ -chimaerin se una a la membrana, lo cual sugiere que la proteína debe atravesar un cambio conformacional masivo que involucra a todos los dominios para insertarse en la membrana. En la figura 32 se muestra el modelo de la estructura activa, unida a la membrana, asumiendo que las superficies hidrofóbicas liberadas por la apertura de la estructura terciaria se van a insertar a la membrana en vez de quedar expuestas al solvente.

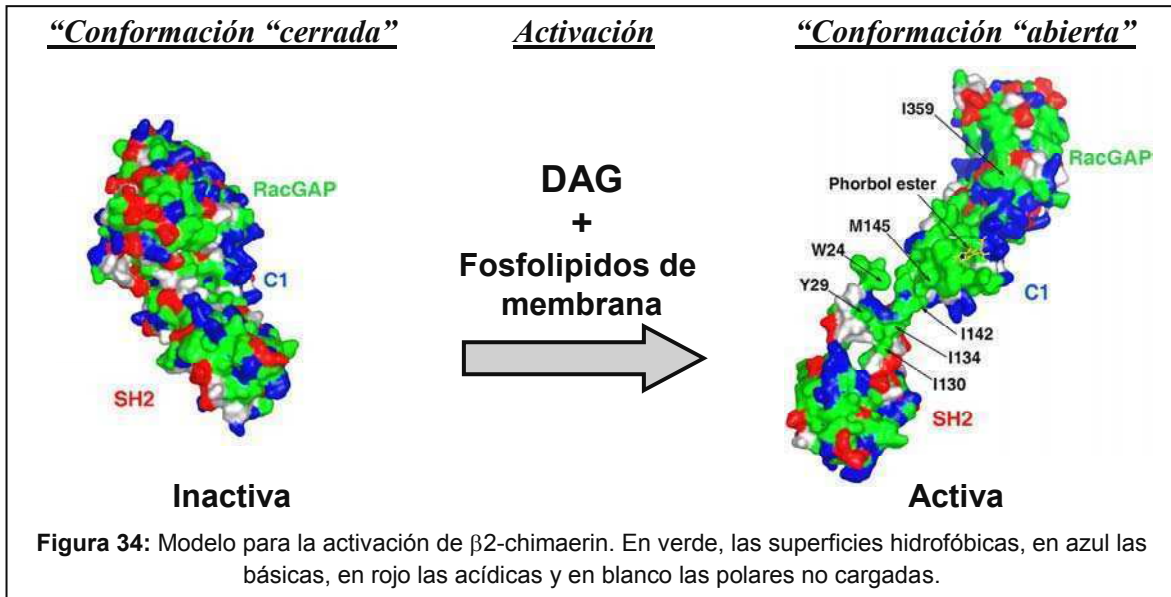


La estructura cerrada también aparenta estar catalíticamente inactiva. Por un lado, las prolinas en posición 21 y 22 bloquean directamente el sitio de unión a Rac. Por otra parte la alfa hélice F' del dominio de GAP ($\alpha F'$) aparenta estar corrida aproximadamente 6 Å respecto de la conformación de p50-RhoGAP unida a Cdc42. La prolina 22 impide que $\alpha F'$ se pueda poner en la posición correcta para unirse a Rac. Por esto, para que la unión ocurra,

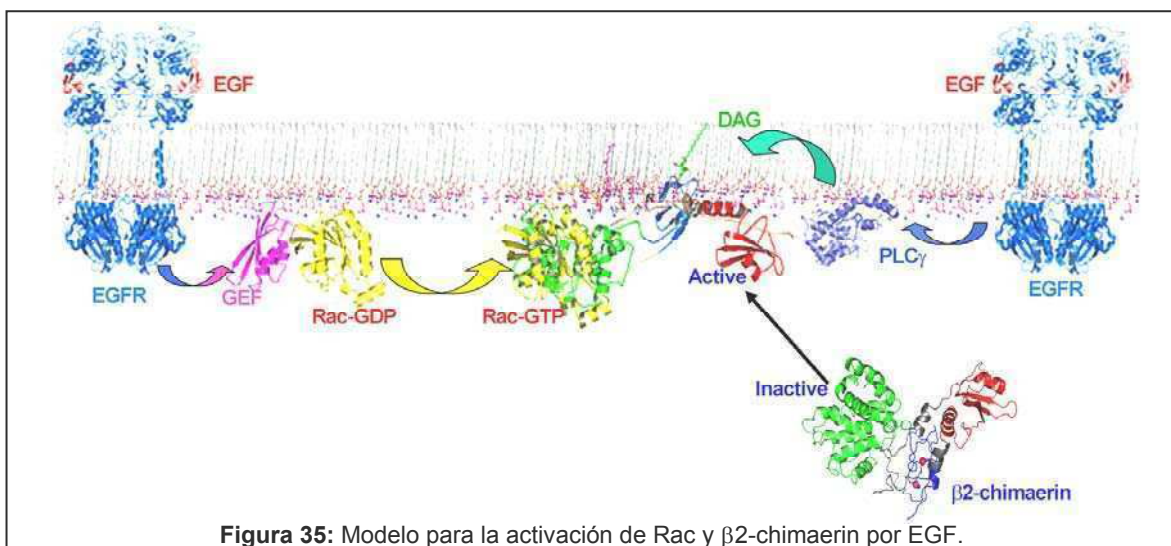
las prolinas 21 y 22 deben moverse fuera de su posición. Las prolinas forman una estructura rígida, y el micro ambiente del sitio de unión a Rac es conformacionalmente restrictivo, con lo cual la única posibilidad es que se muevan los residuos que conectan la dupla de prolinas con el resto de la molécula. Los aminoácidos isoleucina 23 y triptofano 24 están involucrados en uniones hidrofóbicas entre los dominios C1, GAP y N-terminal. Esto implica que se deben romper estas interacciones para que pueda ocurrir la unión con Rac (Figura 33). Esto es coherente con lo observado en los ensayos de Rac GTP, donde se ve que las mutantes que desestabilizan la conformación son potentes Rac-GAPs.



Por lo tanto se propone que para activar a β 2-chimaerin es necesaria la unión de DAG, y la conjunta interacción con los fosfolípidos de membrana, que competirán por las zonas hidrofóbicas del dominio C1 involucradas en interacciones intermoleculares. Según el modelo propuesto, el dominio N-terminal, además de enterrar al dominio C1, ocluye el sitio de unión a Rac del dominio GAP. Estas interacciones intermoleculares se interrumpen cuando el dominio C1 se inserta en la membrana, dando flexibilidad al dominio N-terminal para que libere el sitio activo de Rac-GAP, permitiendo que la $\alpha F'$ se ubique en la conformación activa (Figura 34).



La activación de Rac por receptores del tipo tirosina quinasa como el receptor de EGF (EGFR) está ampliamente estudiada. La consecuente activación de PLC río abajo del EGFR, estimula la translocación a la membrana de $\beta 2$ -chimaerin y la inserción del dominio C1 en la membrana produce el cambio conformacional necesario para activar el dominio de Rac-GAP. Este modelo se muestra en la figura 35. Las SUPER-chimaerin mostraron ser más sensibles a la translocación por tratamiento con PMA (como se vio en los ensayos de fraccionamiento subcelular) y a la mediada por DAG luego de estimular con EGF (como se vio en los experimentos de FRET), lo que valida nuestro modelo.



V- Capítulo Tercero

**Búsqueda de proteínas que interactúan con
el dominio SH2 de β 2-chimaerin**

Como hemos visto en el capítulo anterior, el dominio SH2 de β 2-chimaerin es estructuralmente similar al de la proteína adaptadora APS y su estructura es superponible con la del dominio SH2 de Grb2. Dadas estas semejanzas es lógico pensar que este dominio pueda interactuar con proteínas fosforiladas en tirosina. Si bien no se han encontrado evidencias de que el dominio SH2 de las quimerinas una proteínas fosforiladas en tirosina, se vio que el dominio SH2 de α 2-chimaerin cumple un papel fundamental en la neuritogénesis en células de neuroblastomas [54]. En el capítulo anterior también hemos demostrado que este dominio es esencial para la regulación estérica de β 2-chimaerin. Como sucede con otras proteínas multidominio, el dominio SH2 puede actuar reclutando β 2-chimaerin a la membrana para su activación a través de la interacción con proteínas de membrana fosforiladas en tirosina, o bien reclutando a otras proteínas a la membrana una vez que β 2-chimaerin está anclada a ésta a través de su dominio C1.

V.1 Objetivos

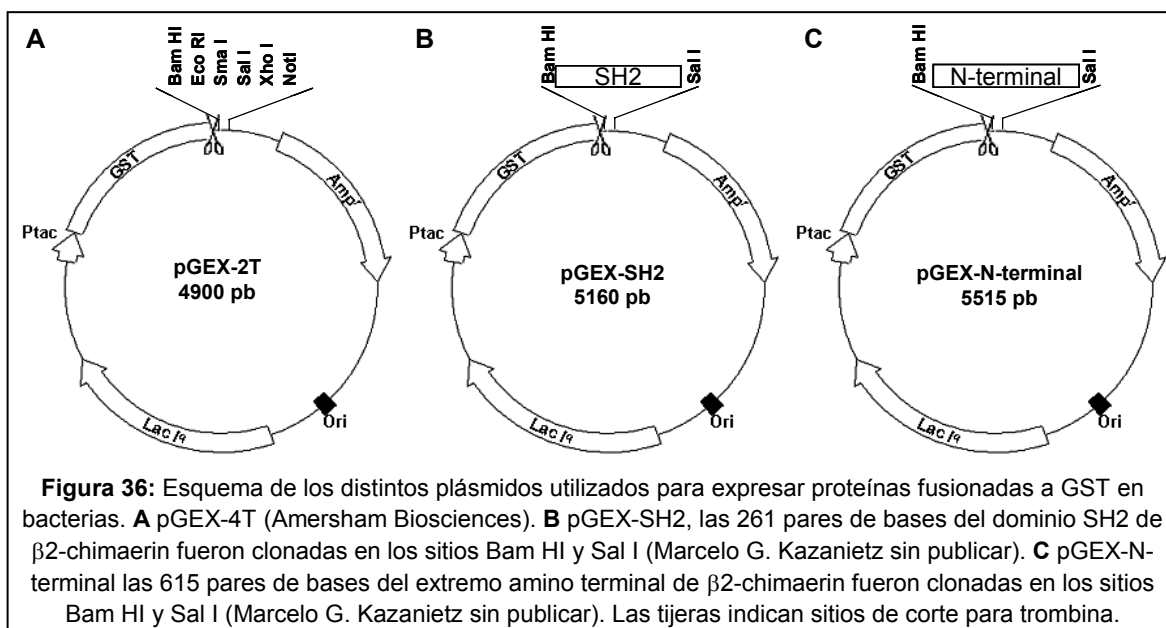
- Demostrar que el dominio SH2 de β 2-chimaerin es capaz de unir proteínas fosforiladas en tirosina.
- Identificar proteínas que interactuen con el dominio SH2 de β 2-chimaerin.

V.2 Resultados:

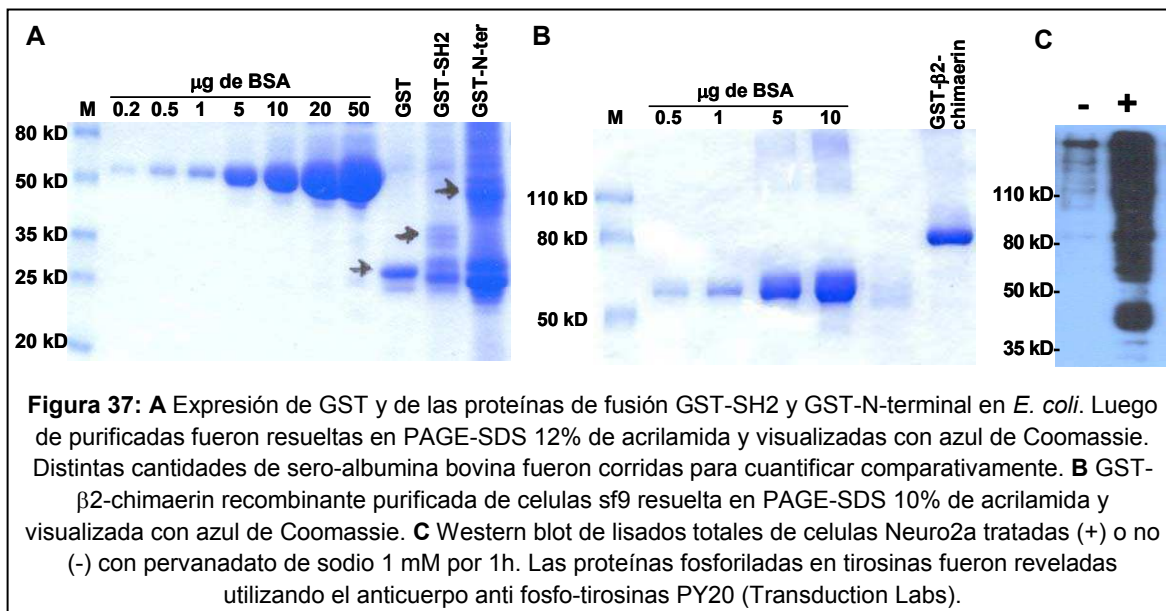
Para identificar proteínas que interactuen con el dominio SH2 de β 2-chimaerin se utilizó una columna de glutation-sefarosa donde se inmovilizó β 2-chimaerin o el dominio SH2 de la misma fusionados a la proteína glutation S-transferasa (glutathione S-transferase, o GST). Sobre esta columna se pasaron lisados de células Neuro2a. Luego de lavar la columna, las proteínas retenidas fueron eluidas, resueltas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) e identificadas por MALDI-MS (por *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Mass Spectrometry*).

a. Obtención de las proteínas recombinantes fusionadas a GST

Como primer paso se recurrió a un sistema de expresión en bacterias. Para ello se utilizaron dos plásmidos recombinantes derivados del plásmido comercial pGEX-4T (Startagene) construidos previamente por el Dr. Marcelo Kazanietz (sin publicar). Estos contienen la secuencia que codifica para el dominio SH2 de β 2-chimaerin. Uno de ellos contiene las 261 pares de bases que codifican para este dominio y fue llamado GST-SH2. En el otro fue clonado un inserto de 615 pares de bases, que codifican para los 205 aminoácidos amino terminales de β 2-chimaerin. Esta construcción fue llamada GST-N-terminal. En la figura 36 ilustra el diagrama de los plásmidos utilizados.



La proteína recombinante fue producida y purificada utilizando bacterias *Escherichia coli* de la cepa BL21, tal como se describe en métodos. Se obtuvo un rendimiento muy bajo, debido a que solo una pequeña fracción de la proteína era soluble en el lisado bacteriano. La figura 37A. muestra un PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie, donde se puede ver el resultado de la purificación de las proteínas. Si bien estas proteínas fueron utilizadas para experimentos a pequeña escala que se describirán mas adelante, se busco una alternativa para la producción de proteína recombinante. Para llevar a cabo los experimentos a gran escala y purificar proteínas que interactuen con el dominio SH2 de β 2-chimaerin, se utilizó GST- β 2-chimaerin expresada en células de insecto Sf9. La producción y purificación de ésta se llevo a cabo en el laboratorio del Dr. James Hurley a partir del plásmido que codifica para la proteína completa pAcG2T- β 2-chimaerin (1-466) (ver Capítulo Segundo). Como se ve en la figura 37B. por este método se obtuvo un alto rendimiento y pureza de esta proteína de fusión.



b. Obtención de los lisados celulares

El protocolo para la obtención de los lisados celulares se detalla en métodos. Para diseñar este protocolo se tuvo en cuenta lo siguiente:

- La línea celular a utilizar: Esta debía cumplir una serie de requisitos. El primero, expresar niveles considerables de β 2-chimaerin. Se discutirá la validez de este

requisito más adelante. Como segundo requisito debía ser una línea celular derivada de ratón (*Mus musculus*) o humana, dado que las bases de datos para el análisis de los espectros obtenidos por MALDI-MS de ratón y humana son las más completas. El tercer requisito para elegir la línea celular a usar fue la disponibilidad y la facilidad de cultivo para la obtención de grandes cantidades de lisados celulares. En la figura 18 se mostró un Western blot donde se analiza la expresión de chimaerin en distintas líneas celulares disponibles en el laboratorio. Fueron descartadas PC12 y Rat1 por ser de rata. Finalmente se escogió la línea Neuro2a sobre SK-N-SH porque presenta niveles más altos de expresión y crecimiento más rápido en cultivo.

- El buffer de lisis: dado que β 2-chimaerin posee un dominio C1 y es translocada a la fracción de membrana por DAG y ésteres de forbol, es posible que interactúe con proteínas asociadas a membranas. El buffer debe por lo tanto tener detergentes para solubilizar las proteínas de membrana sin alterar la conformación de las mismas. Por ello se utilizó un buffer con un detergente no-iónico (1% octylglucósido). Nos fue recomendada por el laboratorio del Dr. James Hurley, la utilización de al menos 100 mM de NaCl, dado que la proteína purificada GST- β 2-chimaerin no es estable a concentraciones menores del mismo. Además, fueron agregados al buffer inhibidores de proteasas, de fosfatasas, agentes reductores, y quelantes de iones.
- Aumentar la fosforilación en tirosinas de las proteínas del lisado. Dado que buscamos proteínas que interactúen con el dominio SH2, sometimos a las células a un tratamiento con pervanadato de sodio 1mM por 30 minutos antes de lisarlas. En la figura 37C se muestra los niveles de fosforilación de proteínas en tirosinas en lisados totales de células tratadas o no con pervanadato de sodio.

c. Proteínas fosforiladas en tirosina interactúan con el dominio SH2 de β 2-chimaerin

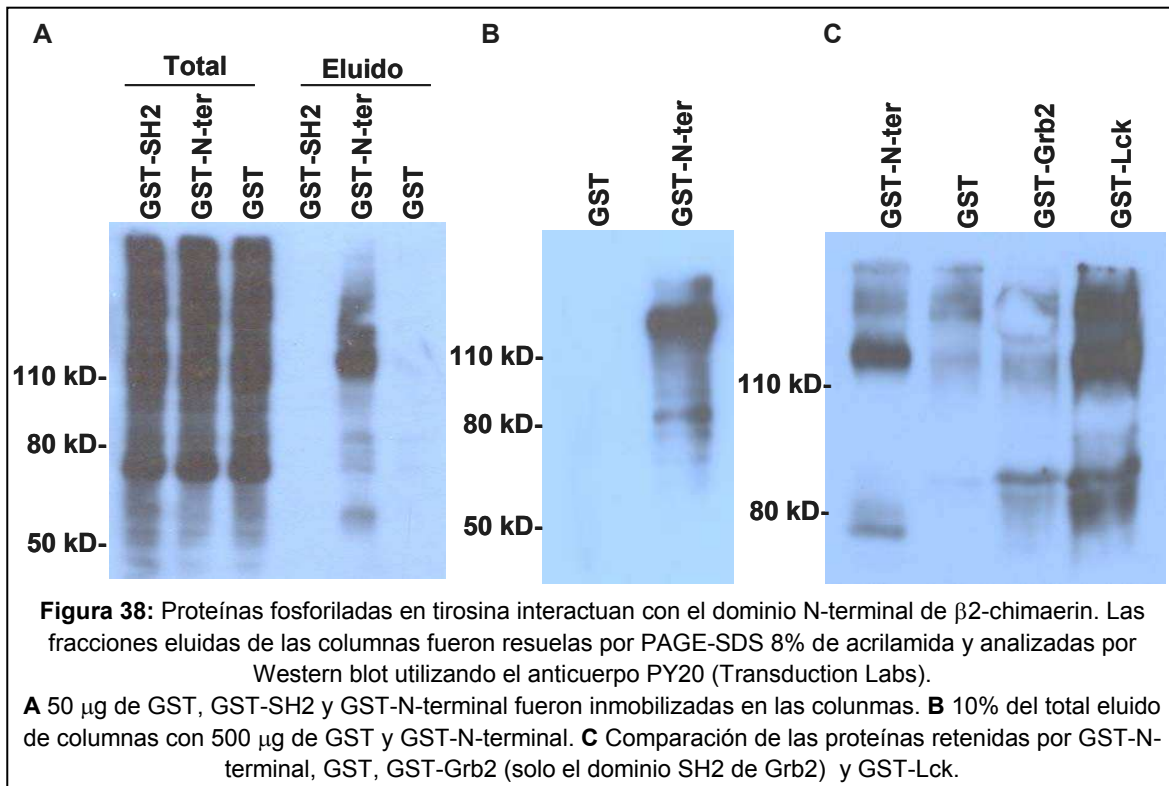
En un primer experimento, se crecieron 5 litros de cultivos de bacterias transformadas con los plásmidos pGEX-SH2 y pGEX-N-terminal y 100 ml de bacterias transformadas con el plásmido pGEX-4T (control negativo). Se indujeron los cultivos con IPTG y se purificaron las proteínas GST-SH2, GST-N-terminal y GST como indica el protocolo en métodos. Las proteínas purificadas se visualizaron por PAGE-SDS teñido con azul de Coomassie (Figura 37A). Dada la baja solubilidad de la proteína de fusión GST-SH2

se obtuvo muy poca de ésta. En cambio se obtuvo mayor cantidad de SH2-N-terminal aunque con una baja pureza. Estas fueron inmobilizadas en columnas y se pasó por ellas lisado de células Neuro2a tratadas con pervanadato de sodio (5 placas de Petri de 100 mm al 90% de confluencia por columna). La fracción eluida de la columna fue concentrada y corrida en PAGE-SDS y transferida a una membrana de PVDF. Se realizó un Western blot utilizando un anticuerpo anti fosfo-tirosinas (PY20, Transduction Labs) para verificar la presencia de proteínas fosforiladas en tirosinas. La figura 38A. muestra la presencia de proteínas fosforiladas en tirosina en la fracción eluida de la columna con GST-N-terminal pero no en la fracción control (GST) ni en la fracción con GST-SH2. El hecho de que no se encuentren proteínas fosforiladas en tirosinas en la fracción eluida de la columna con GST-SH2 se puede atribuir a la menor cantidad de proteína obtenida o a que el dominio SH2 *per se* no es suficiente para la interacción con fosfo-tirosinas. Por este motivo se continuo trabajando con la proteína GST-N-terminal solamente.

Se repitió el experimento anterior utilizando sólo la proteína fusión GST-N-terminal y GST como control. Se crecieron 20 litros de cultivo bacteriano para la producción de GST-N-terminal y 500 ml para GST. Se utilizaron 20 placas de 150 mm de Petri de Neuro2a 90% confluentes tratadas con pervanadato de sodio para obtener el lisado celular. Las fracciones eluidas fueron concentradas y el 90% de éstas se corrieron en un PAGE-SDS que se tiñó con azul de Coomassie, y el resto se utilizó para hacer un Western blot revelando con el anticuerpo anti fosfotirosina PY20. En la figura 38B. se muestra el Western blot donde se pueden observar dos bandas predominantes de aproximadamente 80 kD y 120 kD. En el gel teñido con azul de Coomassie se observaron una decena de bandas muy tenues, la mayoría de las cuales estaban presentes también en el control, y ninguna coincidía con las bandas presente en el Western blot por lo que estas bandas no fueron analizadas por MALDI-MS y fueron descartadas.

Para comprobar que las bandas de 80 kD y 120 kD correspondían a fosfotirosinas que interactuaban específicamente con el dominio SH2 de β 2-chimaerin, se utilizaron como controles dos proteínas de fusión distintas. La primera presenta el dominio SH2 de Grb2 fusionado a GST (GST-Grb2 SH2) y la segunda, la proteína completa Lck, una proteína que contiene un dominio SH2, fusionada a GST (GST-Lck). En la figura 38C se muestra el

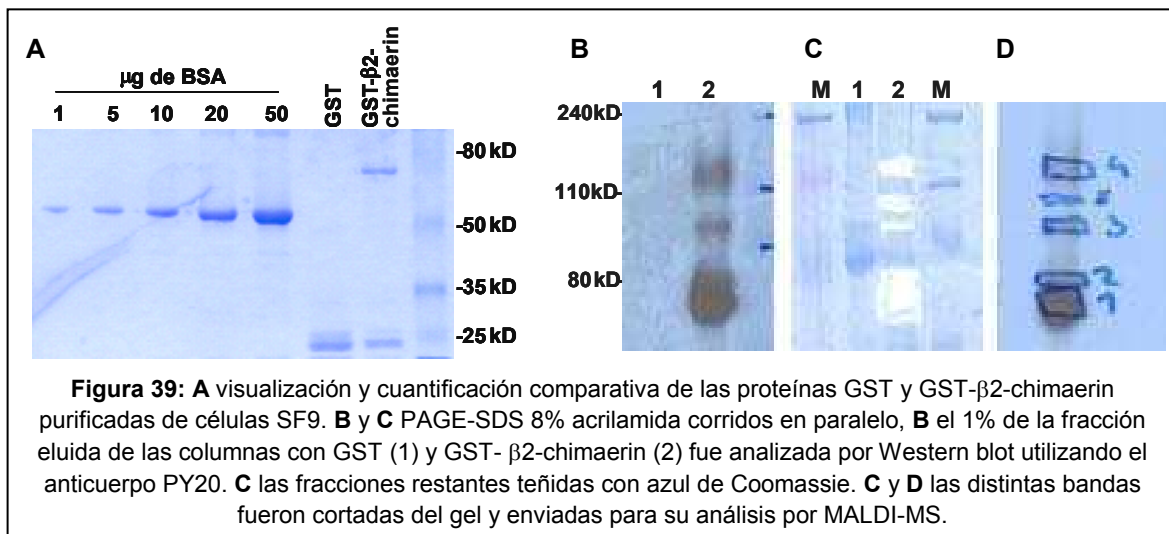
Western blot respectivo, donde se ve que las bandas de 80 kD y 120 kD interactúan de forma específica con el dominio SH2 de β 2-chimaerin.



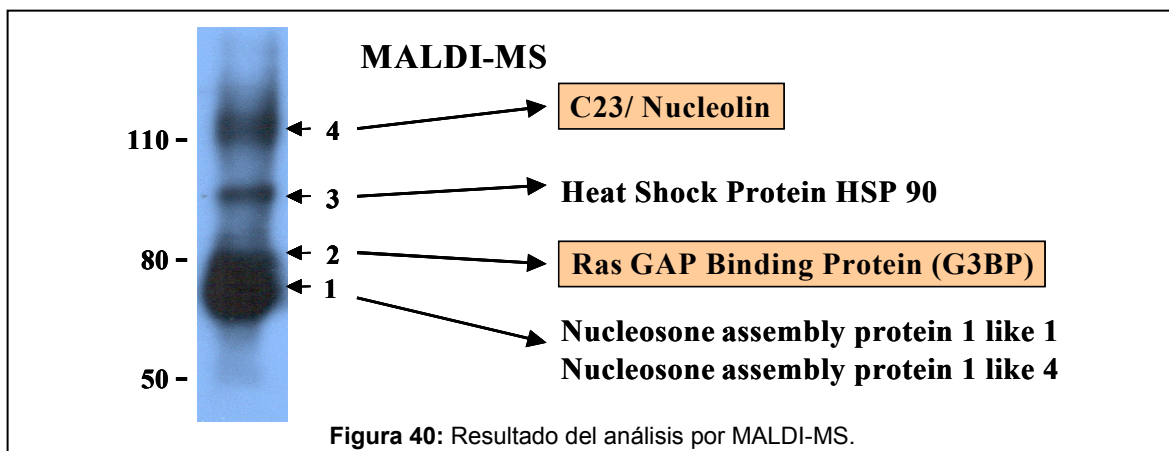
d. Identificación de las proteínas fosforiladas en tirosina que interactúan con β 2 chimaerin

Dado que el método utilizado no tenía la sensibilidad suficiente para aislar las fosfo proteínas de 80 kD y 120 kD, decidimos utilizar la proteína recombinante GST- β 2-chimaerin. Esta proteína de fusión había sido purificada de células de insecto Sf9 en el laboratorio del Dr. James Hurley con el propósito de cristalizarla y resolver su estructura (Capítulo Segundo). Se utilizaron columnas con miligramos de GST- β 2-chimaerin y GST como control. Se filtro por las columnas el lisado de 40 placas de Petri de 150 mm 90% confluyente sometidas a tratamiento con pervanadato sódico. Una centésima parte del eluido se analizó por Western blot para detectar proteínas fosforiladas en tirosina. El resto se concentró y se resolvió mediante PAGE-SDS y se visualizó con azul de Coomassie. Ambos geles, tanto para el Western blot como para la tinción con Coomassie, fueron corridos en paralelo. El resultado se muestra en la figura 39. Las bandas del gel teñido con Coomassie

fueron cortadas para su análisis por MALDI-MS. La porción del gel restante se secó sobre papel de filtro y es lo que se muestra en la figura 39C. Se cortaron 5 bandas del gel como se muestra en la figura 39D. Las bandas 1 y 2 correspondían a la proteína detectada con el anticuerpo anti fosfo-tirosina de aproximadamente 80 kD. La banda número 3 es una banda correspondiente a una proteína fosforilada en tirosina nunca antes observada. La banda número 4 correspondió a la fosfoproteína de aproximadamente 120 kD. La banda número 5 no se correspondía con ninguna proteína fosforilada en tirosina.



Las muestras fueron enviadas para el análisis por MALDI-MS al servicio de proteómica del Howard Hughes Medical Institute, Columbia University. De las 5 bandas enviadas a identificar, solo la número 5 no pudo ser identificada (Figura 40).



La primer banda correspondió a dos proteínas claramente relacionadas. Estas son similares a la proteína *nucleosome assembly protein 1*, y aparecen en las bases de datos como *nucleosome assembly protein 1-like 1* y *nucleosome assembly protein 1-like 4*. Su función es desconocida.

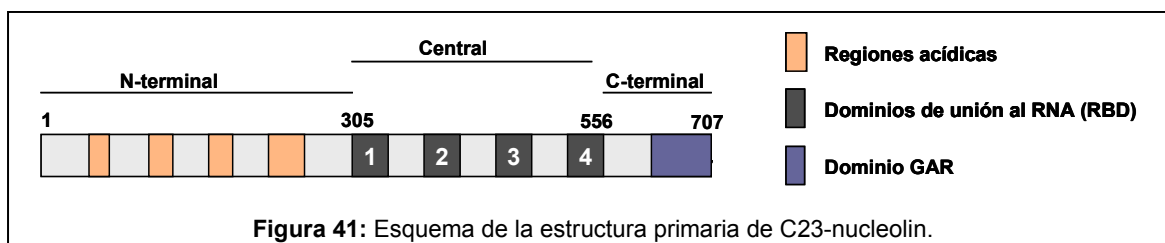
La segunda se identificó como una proteína que se une a Ras-GAP. En las bases de datos aparece con el nombre de *Ras-GTPase activating protein binding protein* (G3BP).

La tercer banda correspondió a una *heat shock protein*, HSP-90 beta.

La cuarta banda se identificó como C23-Nucleolin, una proteína nucleosomal.

e. C23-nucleolin.

Nucleolin, también conocida como C23 por su movilidad en geles de dos dimensiones, es una proteína multidominio de 77 kD. Fue primero identificada como un importante componente nucleolar, representando el 10% de las proteínas nucleares [179]. Dentro del nucleolo, está involucrada en la biosíntesis de ribosomas, la regulación de la estructura del nucleolo, la regulación de la transcripción de la RNA polimerasa I, el procesamiento de pre-mRNAs, y la regulación de la localización nucleolar de proteínas ribosomales. Esta proteína también fue descrita como una proteína de 110 kD, aunque el clonado molecular de la misma en hámster reveló que posee 713 aminoácidos [180]. Esta diferencia de tamaño se debe a la composición del dominio N-terminal, que puede estar altamente fosforilado, metilado y ADP-ribosilado [181]. La región N-terminal posee regiones acídicas intercaladas con secuencias básicas con múltiples sitios de fosforilación. El dominio central contiene cuatro sitios de unión a RNA (RBD por *RNA Binding Domain*) también conocidos como motivos de reconocimiento del ARN (RRM por *RNA Recognition Motif*). El dominio carboxilo terminal es rico en glicinas, argininas y fenilalaninas, y contiene altos niveles de N, N-dimetilargininas [182]. En la figura 41 se ilustra un esquema de la estructura primaria de C23-nucleolin humana.

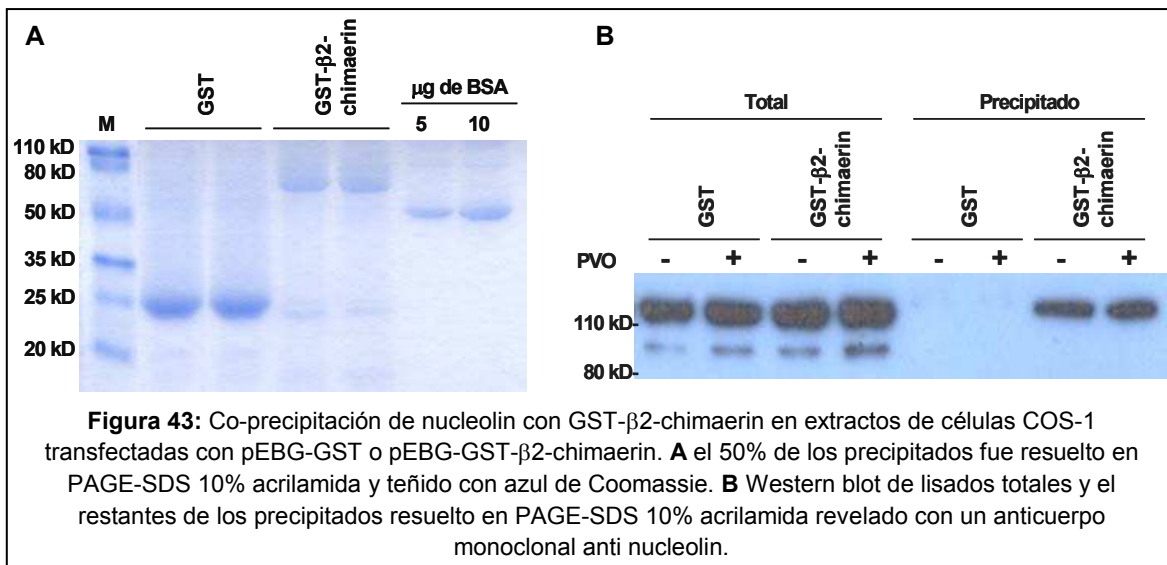
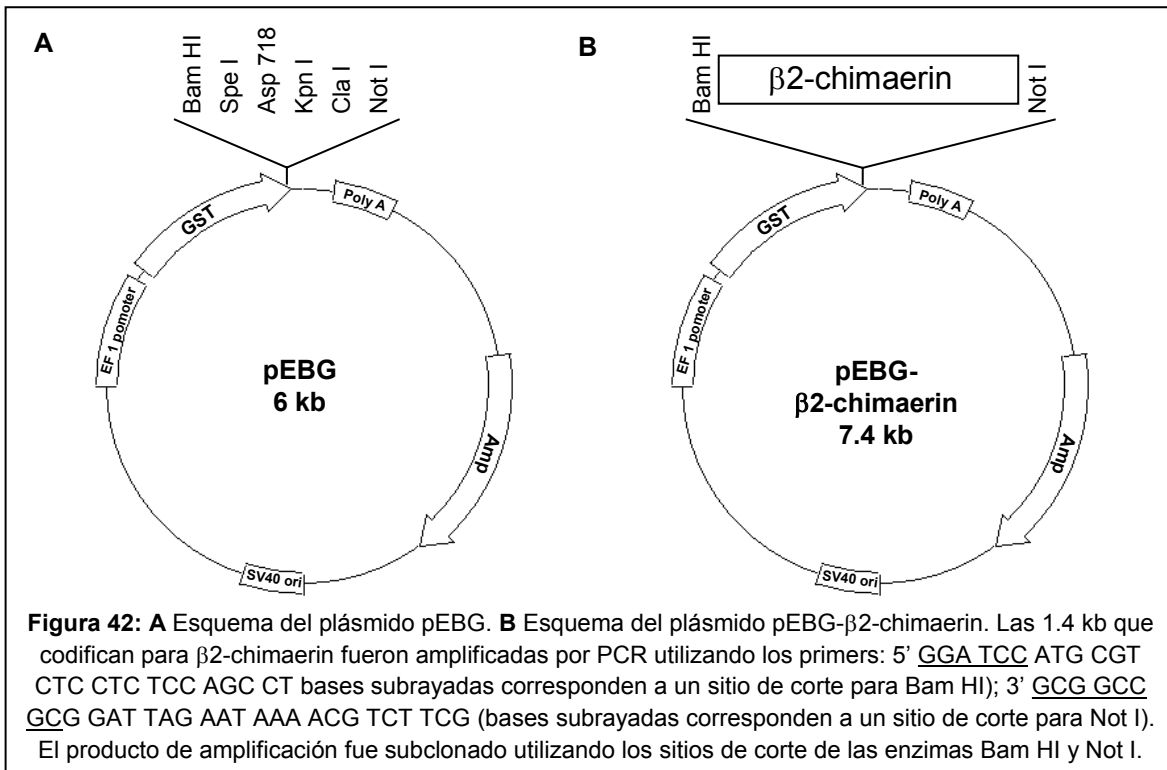


Nucleolin es sustrato de varias quinasas incluyendo casein kinase II, Cdc2, y PKC- ζ . La fosforilación de nucleolin por estas proteínas ocurre antes y durante mitosis, y se cree que es un mecanismo que regula su función durante la mitosis. C23 fue implicada en el transporte de proteínas del núcleo al citoplasma [183], aunque los niveles de proteína encontrados en el citoplasma son muy bajos. La región N-terminal es requerida para el transporte nuclear, aunque no es suficiente, ya que no posee una señal de exportación nuclear. Durante la infección con ciertos virus, esta proteína es capaz de translocar al citoplasma. A su vez, C23 nucleolin se encuentra predominantemente en el citoplasma en células IEC-6 cuando son crecidas en ausencia de laminina [179]. En células Jurkat, se vio que se redistribuye al citoplasma, tras la activación del receptor de células T (*T-cell receptor* o TCR), uniéndose específicamente a la cadena CD3 ϵ del complejo del TCR [184]. C23-nucleolin también fue encontrada en la superficie celular asociada al citoesqueleto de actina. Es translocada a la superficie celular por una vía de secreción alternativa independiente del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi [185]. También fue propuesta como un receptor de superficie, involucrado en la entrada a la célula del virus del HIV. Por último, nucleolin fue identificada como la proteína humana *DNA helicase IV* capaz de desenrollar cadenas de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN en forma dependiente de ATP [186, 187].

f. Nucleolin co-precipita con GST- β 2-chimaerin

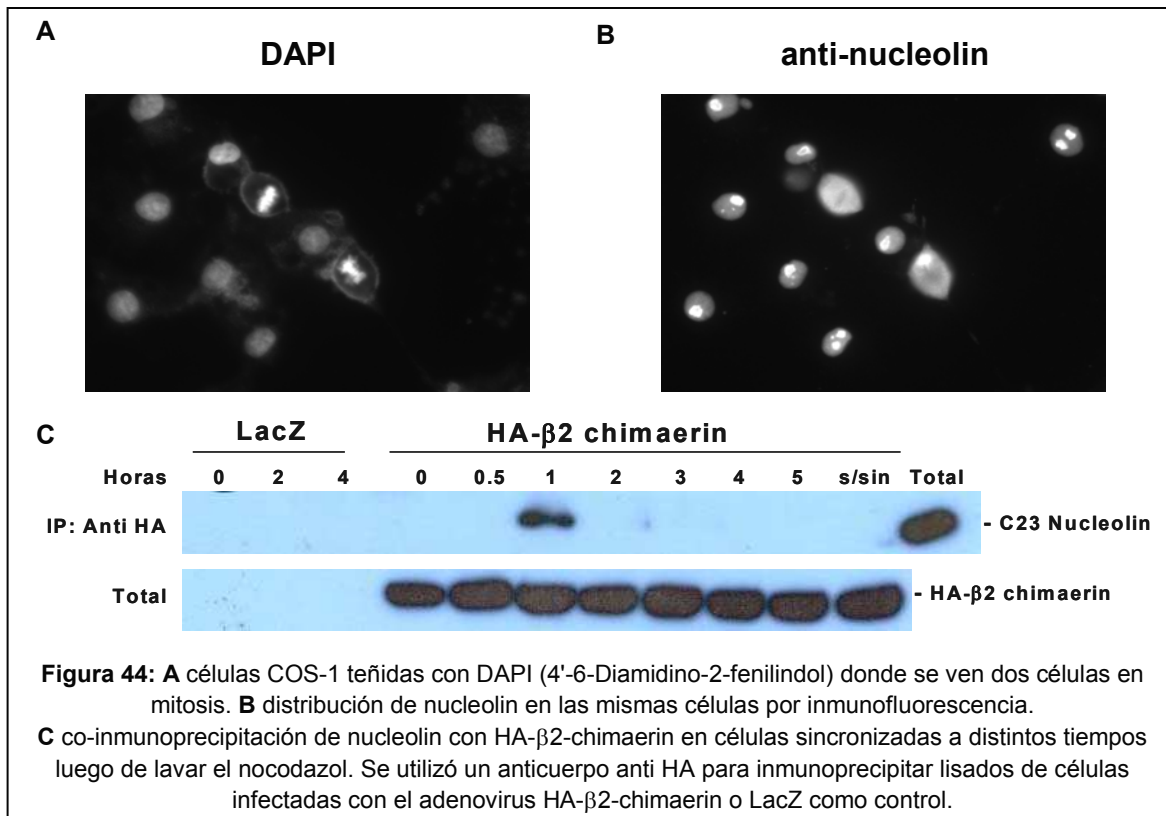
Para probar la interacción entre nucleolin y β 2-chimaerin, se utilizó el plásmido de expresión en mamífero pEBG, que tiene un epítipo GST. Se amplificó por PCR la secuencia codificante para β 2-chimaerin añadiendo sitios de corte para enzimas de restricción. Esta secuencia se clonó en el vector pEBG río abajo del epítipo GST (Figura 42). Células COS-1 fueron transfectadas con el plásmido pEBG, que expresa GST como control, y con el plásmido pEBG- β 2chimarín. Cuarenta y ocho horas después las células fueron tratadas o no tratadas con pervanadato de sodio por media hora. Se procedió con el ensayo de co-precipitación según se indica en métodos. Para detectar la presencia de C23-nucleolin, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-nucleolin cedido gentilmente por el Dr. Benigno Valdez (Baylor College of Medicine, Houston, TX). El resultado, que se muestra en la

figura 43, afirma que existe asociación específica entre $\beta 2$ -chimaerin y nucleolin, y que ésta no se incrementa por el tratamiento con pervanadato de sodio.



g. Nucleolin interactúa con chimaerin durante la mitosis

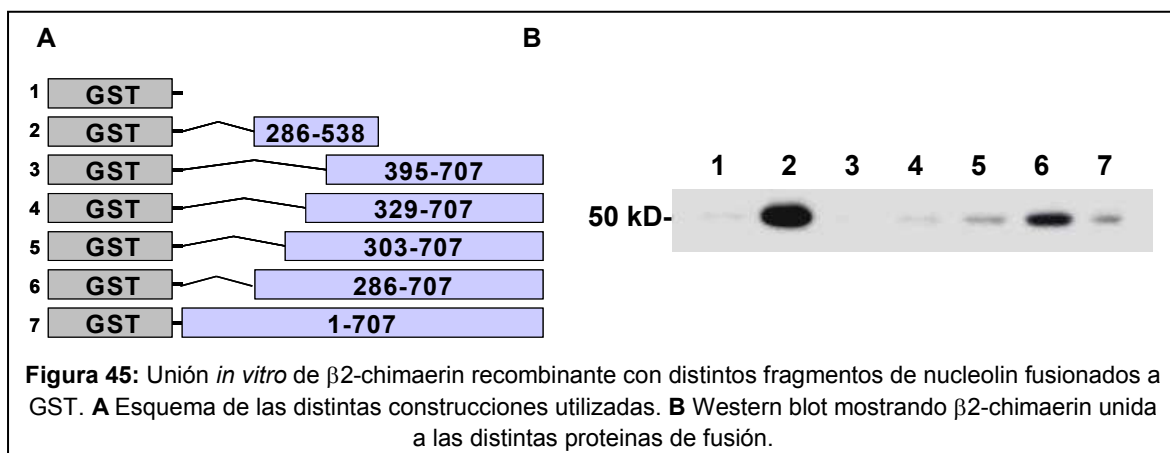
Para analizar la co-localización en el ámbito celular de $\beta 2$ -chimaerin y nucleolin se realizaron experimentos de fluorescencia e inmunofluorescencia. Células COS-1 fueron cultivadas sobre cubre objetos de vidrio y transfectadas o no con plásmidos derivados del pEGFP. El plásmido que expresa GFP-nucleolin también fue cedido generosamente por el Dr. Benigno Valdez. El vector que codifica para GFP- $\beta 2$ -chimaerin fue construido en el laboratorio previamente [40]. Se utilizó el anticuerpo monoclonal contra nucleolin y un segundo anticuerpo contra Ig de ratón conjugado con el fluoróforo Cy3 (Molecular Probes) para llevar a cabo las inmunofluorescencias. Tanto nucleolin endógena como la transfectada con el epítipo GFP se localizan mayoritariamente en el núcleo, principalmente en el nucleolo, y no se pudo resolver la presencia de proteína fuera del núcleo. Durante la mitosis nucleolin se distribuye al citoplasma, y se puede apreciar co-localización con $\beta 2$ -chimaerin (Figura 44A.).



Para comprobar si existe mayor asociación durante la mitosis entre $\beta 2$ -chimaerin y nucleolin, se realizó un experimento de co-inmunoprecipitación en células COS1 infectadas con un adenovirus que expresa $\beta 2$ -chimaerin fusionada a un epítoto HA [47]. Las células, tras la infección, fueron sincronizadas con un método de “doble ronda” utilizando primeramente hidroxiiurea y luego nocodazol (ver métodos). El nocodazol es un inhibidor reversible de la polimerización de microtúbulos. El tratamiento con éste arresta a las células en prometafase dado que no se pueden formar los husos mitóticos. En la figura 44B. se muestra la co-precipitación de nucleolin con $\beta 2$ -chimaerin a distintos tiempo tras lavado el nocodazol. Se detectaron altos niveles de asociación a la hora luego de haber lavado el inhibidor. A este tiempo se vio el máximo de células en mitosis.

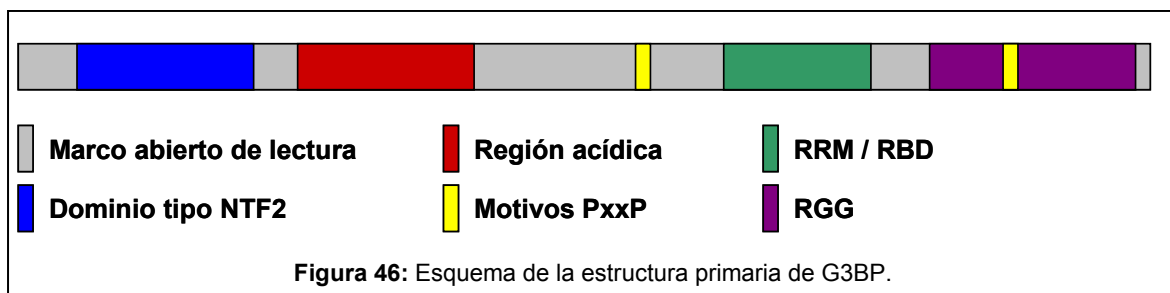
h. Unión in vitro de distintas porciones de nucleolin con $\beta 2$ -chimaerin

Se utilizaron plásmidos derivados del pGEX, cedidos por el Dr. Valdez, que expresan en bacterias distintos fragmentos de nucleolin fusionados a GST. La figura 45A muestra un esquema de las distintas proteínas de fusión utilizadas. Las proteínas fueron purificadas, y luego incubadas con $\beta 2$ -chimaerin recombinante. El resultado se muestra en la figura 45B. Los aminoácidos 286-538 son suficientes para la interacción, mientras los aminoácidos 286-329 son necesarios.



i. G3BP (RasGAP SH3 Binding Protein)

La familia de proteínas de G3BP comprende isoformas evolutivamente conservadas en eucariotas. En mamíferos son tres las isoformas presentes, codificadas por dos genes G3BP1 y G3BP2 que por procesamiento diferencial pueden dar G3BP2a y G3BP2b. Estas se expresan de forma ubicua y están involucradas en numerosos procesos biológicos, aunque su función es aún enigmática. Fue aislada por primera vez como una proteína capaz de unirse a RasGAP [188]. La estructura primaria presenta en el extremo N-terminal un dominio tipo-NTF2 (*NTF2-like Nuclear Transport Factor 2-like*) (Figura 46). Esto hace pensar que puede cumplir funciones como transportador nuclear. La región central posee un dominio ácido y motivos ricos en prolina (PxxP). Los motivos PxxP son secuencias mínimas necesarias para la interacción con los residuos aromáticos de los dominios SH3. Si bien G3BP fue identificada como una proteína que interactúa con el dominio SH3 de RasGAP, esta interacción parece no estar mediada por los motivos PxxP. Las regiones tipo-NTF2 fueron identificadas como las responsables de esta interacción [189]. El dominio carboxilo terminal contiene dos motivos tradicionalmente asociados con interacción con ARN. Uno de ellos es un motivo RRM, también conocido como RBD, bien definido que es encontrado en la mayoría de las proteínas que unen ARN, como por ejemplo en C23-nucleolin. El segundo es un dominio rico en arginina y glicina (RGG, *por Arginine-Glycine Rich*) poco conservado. Los dominios RGG por lo general son encontrados en proteínas que unen ARN y actúan de forma cooperativa con dominios RRM.

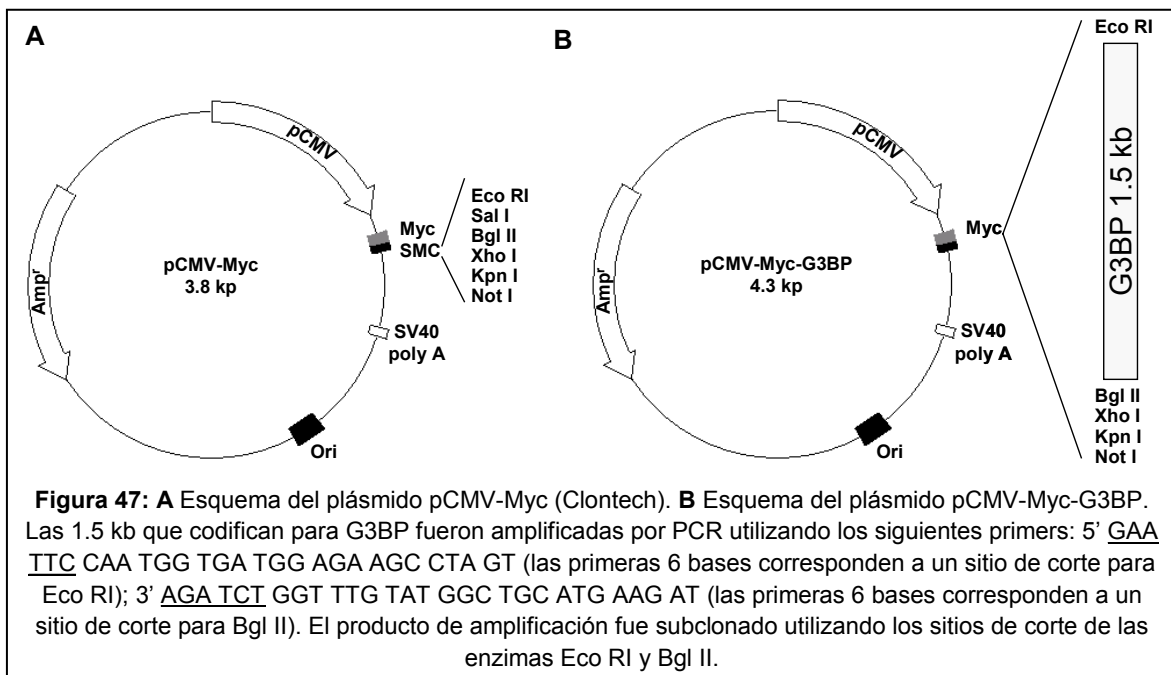


La mayoría de las publicaciones referidas a G3BP reportan funciones río abajo de Ras en la regulación de la proliferación y/o la supervivencia celular. Algunos estudios la implican en la regulación del ciclo celular. En *Drosophila* fue clonada bajo el nombre de Rasputin (*Rin*) y actúa como un nexo entre la señalización a través de Ras y Rho [190].

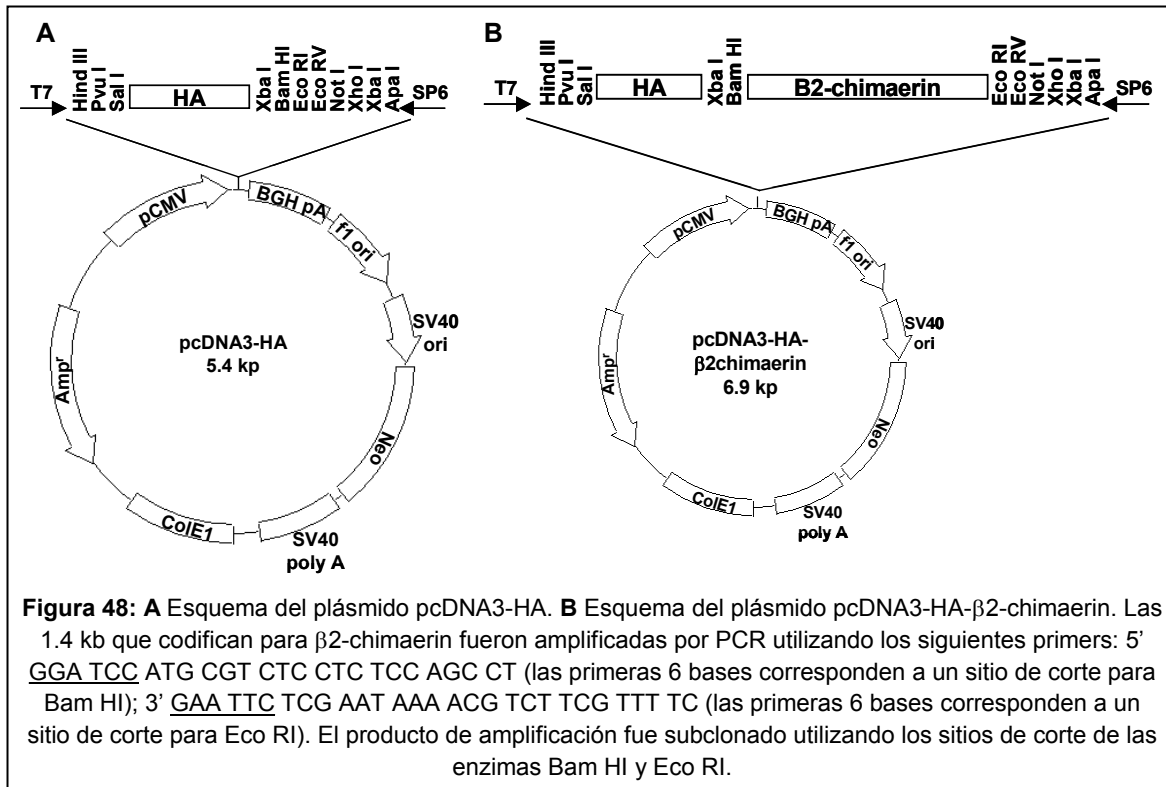
Si bien G3BP fue reportada como una proteína citoplasmática, ésta tiene la capacidad de entrar en el núcleo y actuar como una helicasa de ADN o ARN [191]. También se ha sugerido que puede regular la estabilidad, la traducción o la degradación del ARN. Si bien se sabe muy poco acerca de ésta, se hipotetiza que G3BP actúa como una proteína adaptadora (*scaffold protein*) que une la señalización a través de Ras con el metabolismo de ARN [190].

j. Co-inmuno precipitación de G3BP1 con β 2-chimaerin

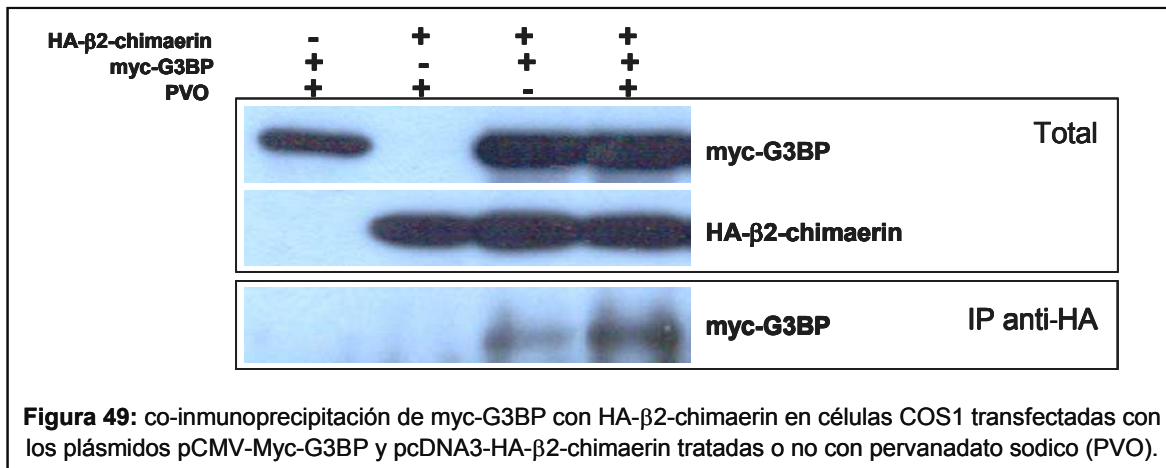
Para probar la interacción entre β 2-chimaerin y G3BP, se procedió al clonado molecular de la región codificante de G3BP. Se utilizó ADN copia de células humanas de cáncer de ovario (cedido por el Dr. José Conejo García, Universidad de Pennsylvania) para amplificar por PCR las 1.4 kb que codifican para G3BP. Este fragmento se clonó en el vector pCMV-Myc (Clontech) para su expresión en células de mamíferos. La estrategia de clonado se muestra en la figura 47.



Para realizar co-inmunoprecipitaciones, se subclonó la secuencia codificante para β 2-chimaerin en un vector derivado del pcDNA3 (Invitrogen) al cual se le añadió un epítipo HA (cedido por la Dra. Margaret Chou, Universidad de Pennsylvania). El esquema de clonado se muestra en la figura 48.



Se transfectaron células COS-1 con ambos pCMV-Myc-G3BP y pcDNA3-HA- β 2-chimaerin o los plásmidos sin inserto en el caso de los controles y se crecieron durante 48 horas. Las células fueron o no tratadas con pervanadato de sodio por 30 minutos y se procedió con la inmunoprecipitación utilizando anticuerpo contra el epítipo HA conjugado con agarosa (Santa Cruz) para la precipitación como se indica en Métodos. Si bien este experimento fue realizado una sola vez, el resultado preliminar, que se muestra en la figura 49 sugiere que hay asociación entre G3BP y β 2-chimaerin, y que esta asociación se incrementa con el tratamiento con pervanadato de sodio.



Estos resultados sugieren que G3BP interactúa con β2-chimaerin. No hemos encontrado diferencias en los niveles de Rac-GTP (dato no mostrado) en células sobre expresando G3BP comparadas con células transfectadas con vector vacío. Esto puede deberse a niveles de transfección bajos, o a que el sistema de células COS-1 no es el adecuado. Sin embargo, el hecho de que ambas proteínas interactúen, sugiere un papel para G3BP en la señalización vía Rac parecido al reportado para la vía de Ras.

V.3 Conclusiones

Según los datos obtenidos en este capítulo podemos afirmar que el dominio SH2 es capaz de unir proteínas fosforiladas en tirosina. Debido a que la proteína de fusión entre este dominio y GST es altamente insoluble, no hemos podido aislar a estas fosfo-proteínas interactuantes. Estas proteínas fueron detectadas con un anticuerpo anti fosfotirosinas y no interactúan con el dominio SH2 de Grb2 ni con la proteína Lck, lo cual indica que la interacción es específica.

Sin embargo hemos aislado proteínas fosforiladas en tirosina que interactúan con la secuencia completa de la proteína β 2-chimaerin. De estas proteínas aisladas de las 5 bandas analizadas por MALDI-MS, tres de ellas contienen dominios RRM o RBD, y este dominio es suficiente y necesario para la unión con β 2-chimaerin en el caso de C23-nucleolin. Los dominios RRM son dominios de unión al ARN, presentes en la mayoría de las proteínas que unen ARN.

La proteína C23/nucleolin es una proteína abundante del nucleosoma, pero fue reportada en numerosas ocasiones como una proteína citoplasmática, de superficie celular y de membrana. Dada la promiscuidad de esta proteína y los altos niveles de expresión endógenos, ha sido muy difícil establecer un papel claro para esta proteína en la regulación de β 2-chimaerin. Hemos comprobado que ambas proteínas co-precipitan en lisados celulares. Dado que nucleolin se localiza principalmente en el núcleo, y su estado de fosforilación cambia durante la mitosis [179], hemos analizado la interacción entre ambas durante este estadio. Hemos visto que la interacción se incrementa cuando las células se encuentran en mitosis. Esto bien puede ser un artefacto ya que durante la mitosis la envoltura nuclear se desarma, y nucleolin se redistribuye en todo el citoplasma. Si bien ambas proteínas interactúan, no queda claro el significado biológico de esta interacción.

Otra de las proteínas aisladas, G3BP, además de su actividad ADN helicasa [191], fue identificada como una proteína adaptadora que une la proteína con actividad de GAP específica de Ras, RasGAP [190]. Si bien no hemos probado la relevancia fisiológica de esta interacción, es lógico pensar que esta proteína puede actuar reclutando no sólo RasGAP, como fuera reportado, sino también β 2-chimaerin.

Otra de las bandas correspondió a dos proteínas relacionadas, *nucleosome assembly protein 1-like 1* y *nucleosome assembly protein 1-like 4*. Ambas proteínas contienen dominios RBD y su función es desconocida.

La tercer banda correspondió a una *heat shock protein*, HSP-90 beta. Esta proteína es una chaperona molecular involucrada en interacciones con varias proteínas. Si bien no hemos realizado ningún experimento para probar la interacción, no descartamos la posibilidad de que exista relevancia fisiológica en ésta.

VI- Capitulo Cuarto

**Clonado y caracterización de las
quimerinas en el pez cebra (zebrafish)**

Para estudiar la relevancia fisiológica de las quimerinas en un sistema vivo, hemos elegido el pez cebra (*Danio rerio*) como modelo. Este organismo no sólo ha sido ampliamente utilizado para el estudio del desarrollo embrionario, sino que también se lo utiliza como modelo para el estudio de diversos aspectos que van desde la bioquímica hasta el estudio del comportamiento. La secuenciación del genoma del zebrafish todavía no se ha completado, faltando ordenar las distintas porciones de secuencias. Se calcula que el 99% de la secuencia esta representada en los fragmentos desordenados. En este capítulo se mostrará el clonado y caracterización de las quimerinas de zebrafish.

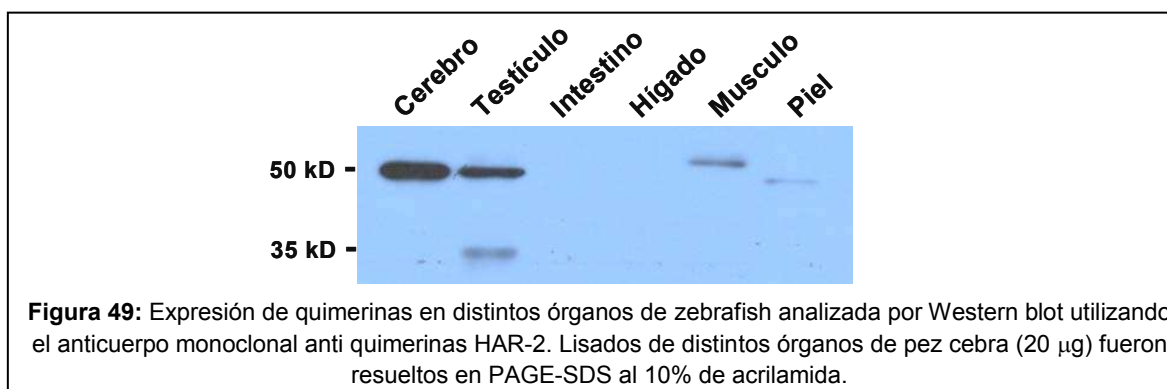
VI.1 Objetivos

- Clonar la/s quimerina/s de zebrafish
- Estudiar su expresión durante el desarrollo embrionario
- Caracterizar bioquímicamente la/s quimerina/s de zebrafish

VI.2 Resultados:

a. Identificación y clonado de las quimerinas de zebrafish

En las bases de datos públicas se encontraron varios ESTs de zebrafish con secuencias homólogas a las de las quimerinas de mamíferos. Del análisis de todos los ESTs encontrados se puede predecir que todos corresponden a un solo gen. Si bien la secuencia del genoma del pez cebra no se ha terminado de ensamblar y existen muchas secuencias desordenadas, se calcula que el 99% del genoma está secuenciado. En estas secuencias no se encontró ningún otro gen que codifique para quimerinas además del encontrado en los ESTs analizados. Analizando por Western blot lisados de distintos órganos de zebrafish, se encontraron proteínas que inmunoreaccionaban con el anticuerpo monoclonal específico contra quimerinas. En la figura 49 se puede ver que en lisados de cerebro, testículo y piel de zebrafish hay una banda de 50 kD que correspondería, por tamaño molecular, a la proteína homóloga a las isoformas 2 de mamíferos. Por otro lado, en testículo se puede ver la presencia de una banda de 35 kD además de la de 50 kD. Esta banda correspondería a la proteína homóloga a las isoformas 1. Si bien en mamíferos las isoformas 1 se expresan en testículo y cerebro, en zebrafish esta isoforma sólo fue detectada en testículo.



A partir de los ESTs se pudo reconstruir parcialmente las regiones 5' y 3' no codificantes. Estas secuencias sirvieron de molde para el diseño de *primers* específicos para amplificar por PCR la región codificante completa y parte de la región 5' no codificante. Utilizando cDNA de cerebro de pez cebra de la cepa Tübingen (Tü), se amplificó y se clonó

en el vector comercial pCRII un fragmento de 1.5 kb (Figura 50). Se aislaron varias colonias transformantes y se secuenciaron 10 clones independientes.

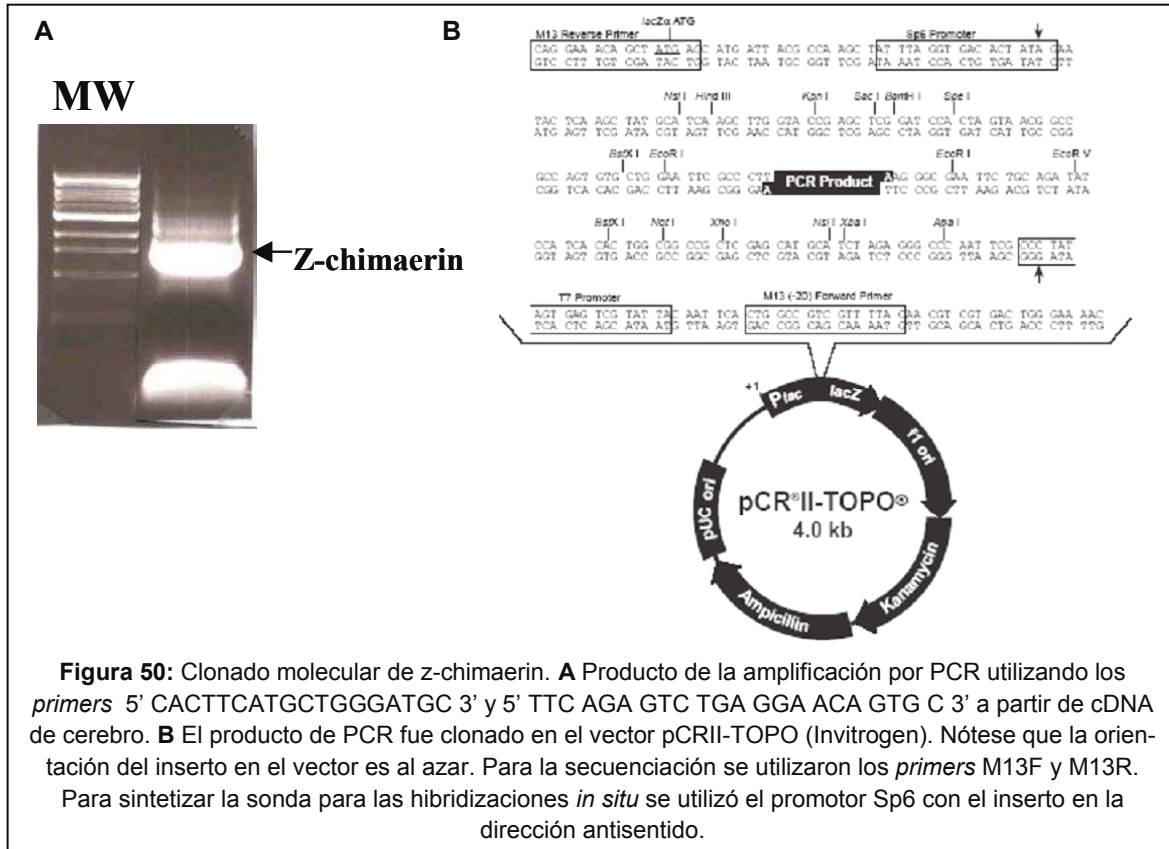


Figura 50: Clonado molecular de z-chimaerin. **A** Producto de la amplificación por PCR utilizando los primers 5' CACTTCATGCTGGGATGC 3' y 5' TTC AGA GTC TGA GGA ACA GTG C 3' a partir de cDNA de cerebro. **B** El producto de PCR fue clonado en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen). Nótese que la orientación del inserto en el vector es al azar. Para la secuenciación se utilizaron los primers M13F y M13R. Para sintetizar la sonda para las hibridaciones *in situ* se utilizó el promotor Sp6 con el inserto en la dirección antisentido.

La proteína de zebrafish homóloga a las quimerinas de mamíferos se denominó z-chimaerin. La secuencia de z-chimaerin codifica para una proteína que tiene un 74% de identidad con α 2-chimaerin y un 65% con β 2-chimaerin (Figura 51). La secuencia fue reportada a la base de datos del NCBI bajo el numero de acceso AY684586. Este gen mapea en el cromosoma 21 del pez cebra, en una región cuya secuencia no ha sido completamente ordenada aún. Además de este gen, no se ha encontrado ningún otro gen que codifique para una isoforma de chimaerin en esta especie. La secuencia completa se muestra en el Anexo.

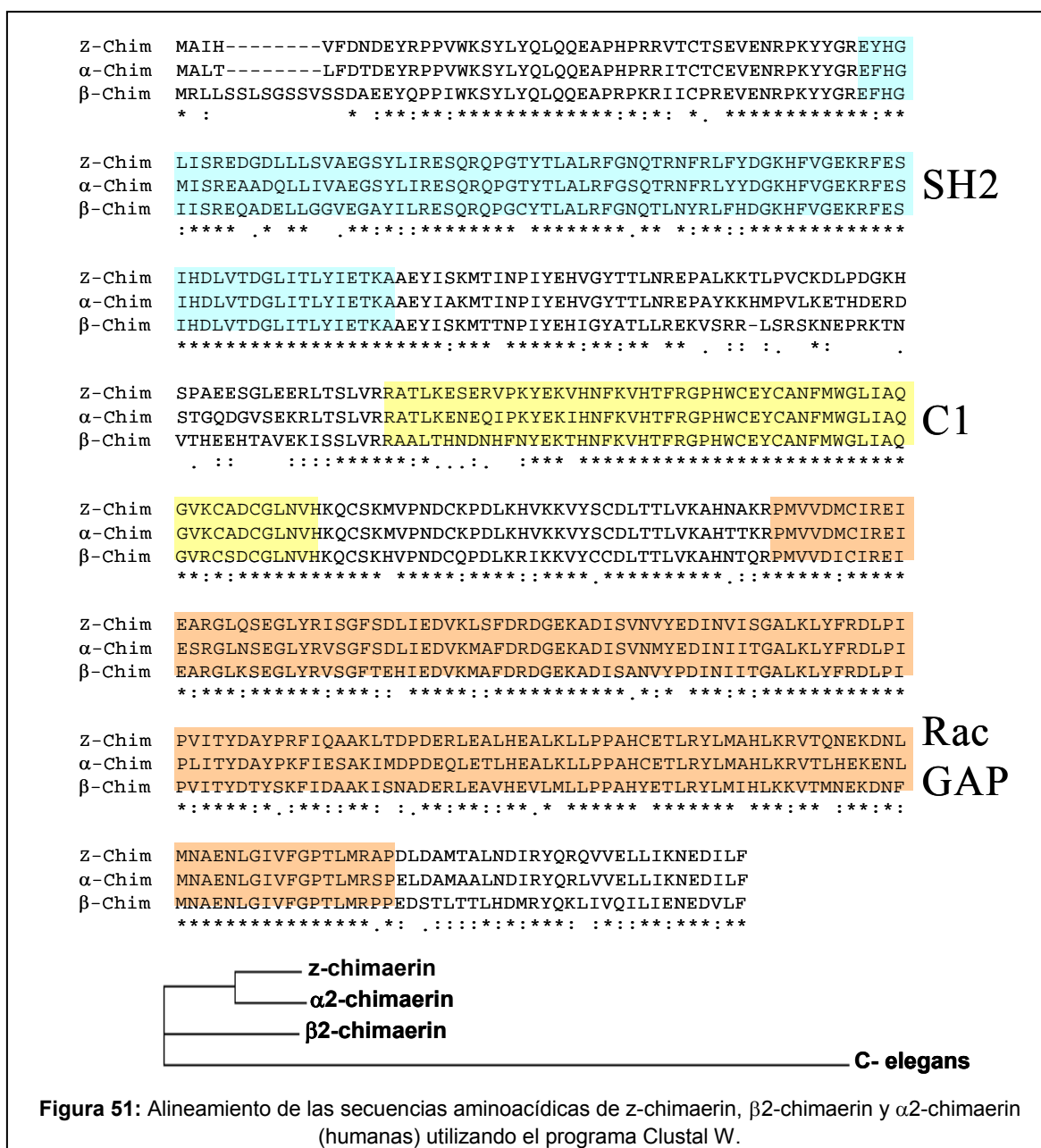
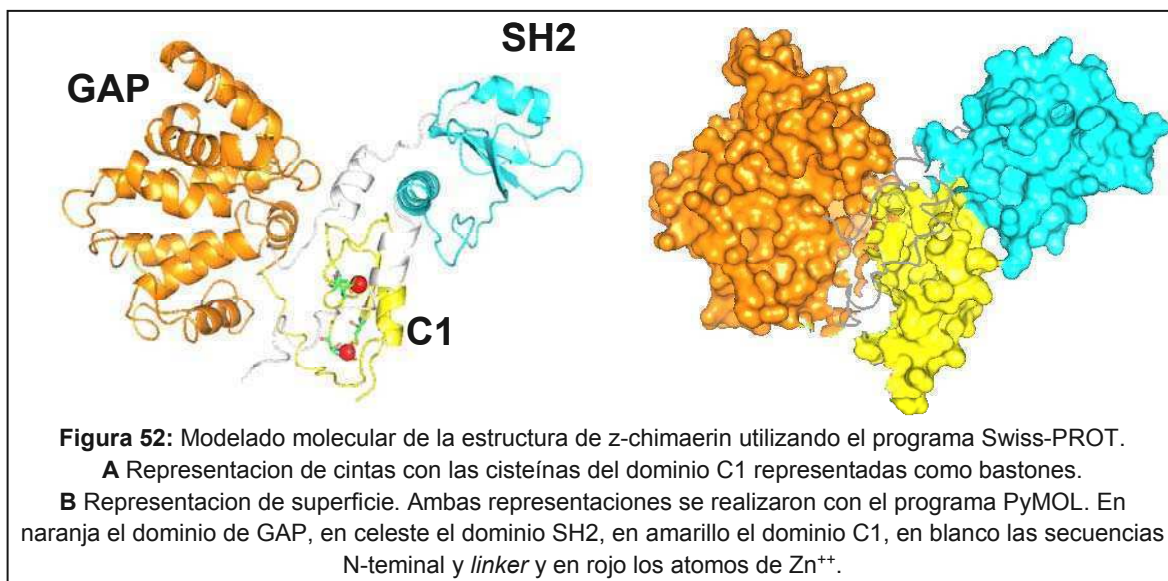
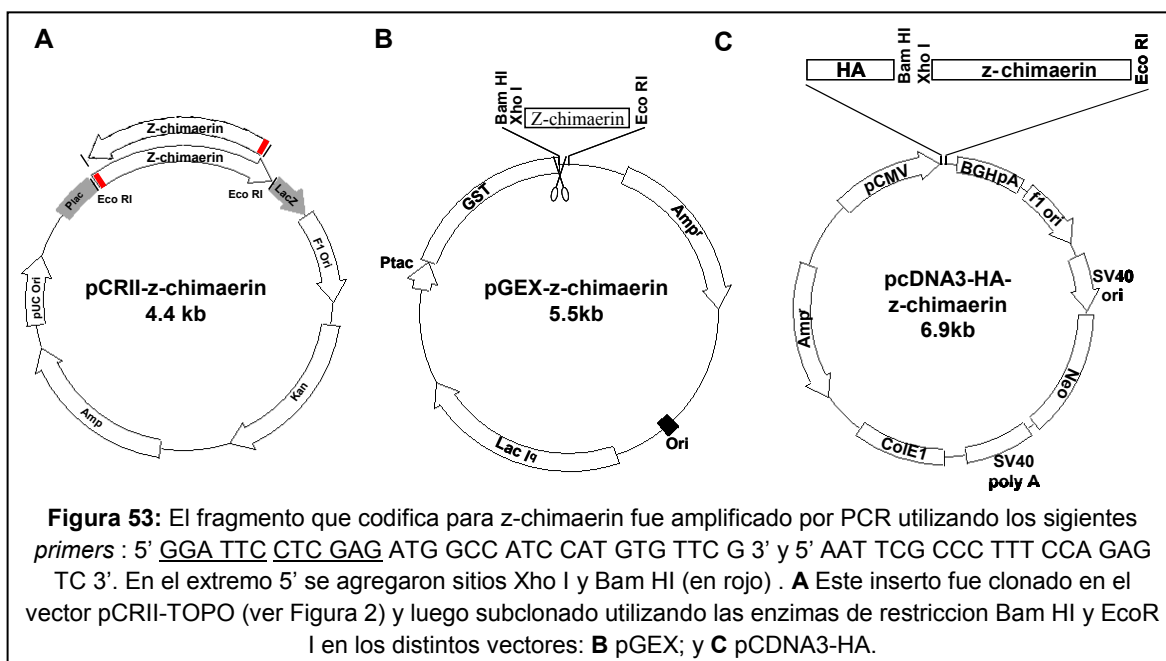


Figura 51: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de z-chimaerin, β 2-chimaerin y α 2-chimaerin (humanas) utilizando el programa Clustal W.

La estructura tridimensional de z-chimaerin fue modelada utilizando la estructura de β 2-chimaerin como molde (Figura 52). Del análisis del modelo y de la secuencia aminoacídica se puede predecir que z-chimaerin tiene todos los aminoácidos necesarios tanto para la unión de ésteres de forbol, como para la actividad de GAP.



Para poder probar la funcionalidad de los distintos dominios de z-chimaerin se clonó la región codificante en distintos vectores. Para ello se amplificó por PCR el marco de lectura abierto utilizando *primers* específicos. En el *primer* 5' se agregó sitios de corte para las enzimas de restricción Bam HI y Xho I. Dado que el plásmido pCRII-TOPO posee sitios de corte para la enzima Eco RI a ambos lados del sitio de clonado, se aprovecharon estos sitios para el subclonado sin importar la dirección del inserto. La figura 53 muestra el esquema de clonado en los distintos vectores.

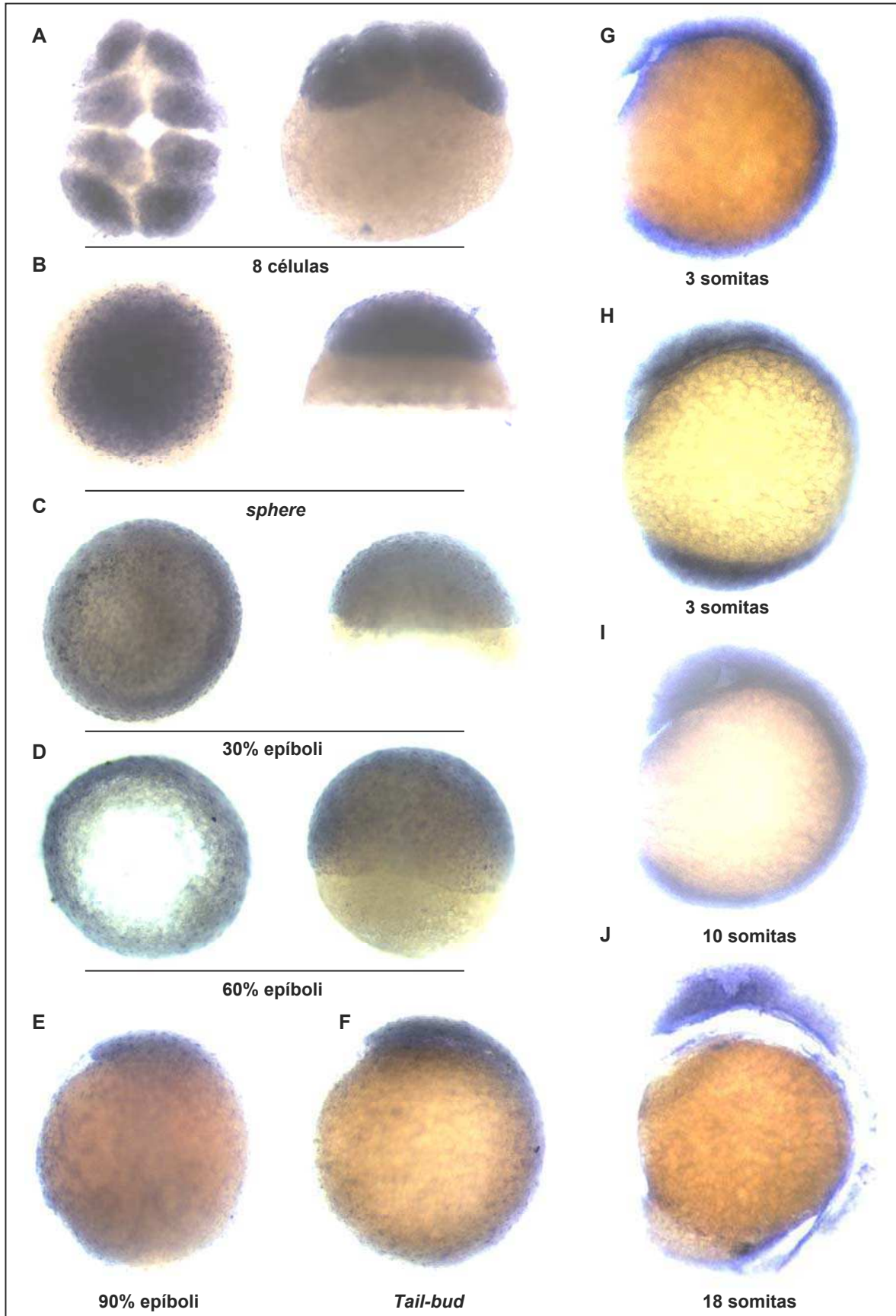


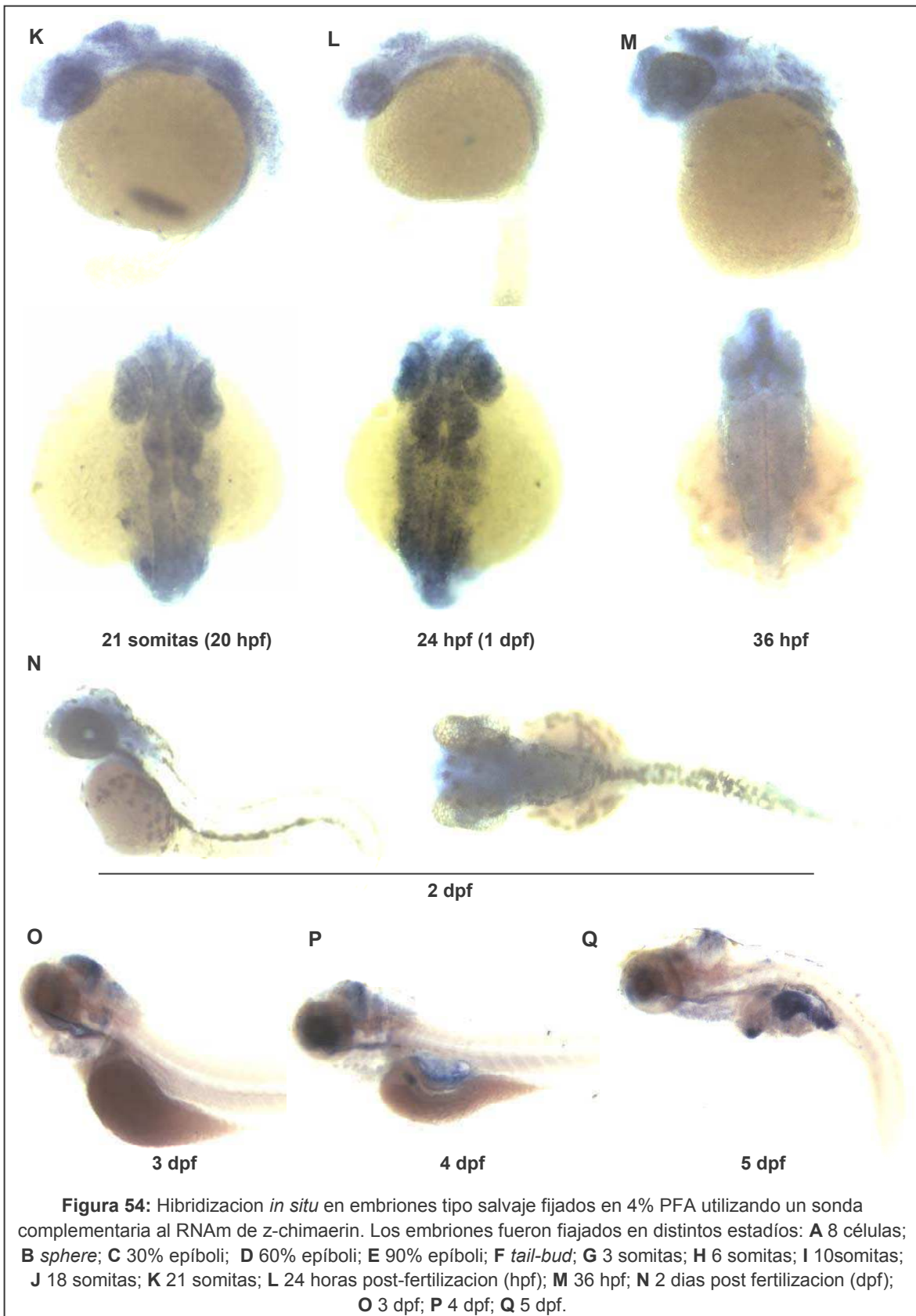
b. Expresión de z-chimaerin durante el desarrollo embrionario

Para estudiar el patrón de expresión de z-chimaerin durante el desarrollo embrionario se utilizaron dos métodos distintos: hibridización *in situ* y Western blot. Para el primero de ellos, se sintetizó una sonda de ARN complementaria para la región 5' del mensajero de z-chimaerin. La síntesis se realizó utilizando como molde un clon del vector pCRII-z-chimaerin con el inserto en posición antiparalela al promotor Sp6 (Figura 50). El vector fue linearizado con la enzima Not I y para la síntesis se utilizó la ARN polimerasa Sp6 como se detalla en métodos.

La presencia de mensajero fue detectada desde los primeros estadios del desarrollo. Esto indica que el ARNm de z-chimaerin es de origen materno dado que la expresión de los genes zigóticos se inicia tras el estadio 1k-cell (1000 células) en lo que se conoce como *midblastula transition* (MBT). Durante las primeras 20 horas post fertilización (hpf) se detectó mensajero en todo el embrión. A las 24 hpf la expresión se hace más evidente en tejido nervioso, y a los 5 días post fertilización (dpf) se detectan altos niveles de mensajero en cerebro, hígado, páncreas y tubo digestivo (Figura 54). Estos resultados son coherentes con los obtenidos por Western blot en tejidos de adulto (Figura 49). Para comprobar la naturaleza del mensajero de origen materno, se realizó una PCR a partir de cDNA de óvulos, y el producto de amplificación fue secuenciado. La secuencia del mensajero materno es idéntica a la del clonado de cerebro.

Se analizó también la expresión de z-chimaerin por Western blot en lisados de embriones en distintos estadios utilizando el anticuerpo anti-quimerinas. Para ello, se prepararon lisados en buffer de siembra a partir de 5 embriones en los distintos estadios. Estos fueron resueltos en PAGE-SDS al 10% de acrilamida y transferidos a membranas de PVDF para seguir con el Western blot como se indica en el protocolo en métodos. El resultado se puede ver en la figura 55. Consistentemente con lo visto por hibridización *in situ*, la expresión de z-chimaerin es anterior al comienzo de la transcripción de los genes zigóticos en la MBT.





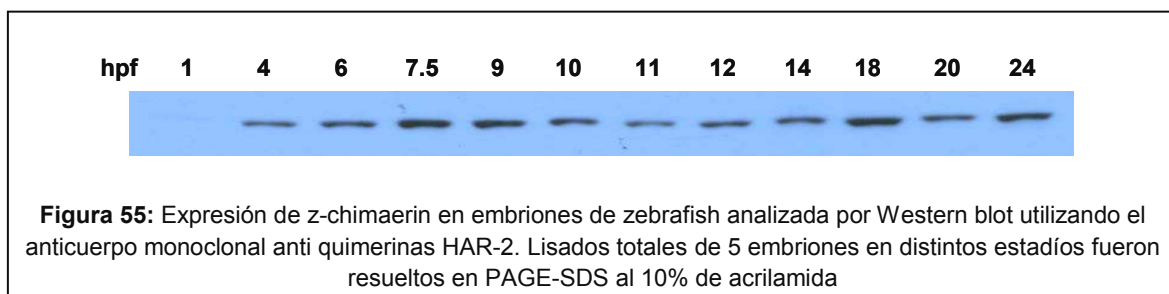


Figura 55: Expresión de z-chimaerin en embriones de zebrafish analizada por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti quimerinas HAR-2. Lisados totales de 5 embriones en distintos estadios fueron resueltos en PAGE-SDS al 10% de acrilamida

c. Análisis de unión a ésteres de forbol de z-chimaerin

Para analizar si z-chimaerin es un receptor de ésteres de forbol y DAG, ésta se expresó y purificó de bacterias *Escherichia coli* como proteína recombinante fusionada a GST (GST-z-chimaerin), utilizando la construcción pGEX-z-chimaerin (Figura 53) como se indica en métodos. Se realizaron estudios de unión utilizando el ligando radioactivo [³H]PDBu. Estos ensayos revelaron que, *in vitro*, z-chimaerin posee una afinidad por los ésteres de forbol en el mismo orden que las PKCs y las isoformas de quimerinas humanas, con una Kd aproximada de 1.9 nM. En la figura 56 se muestra la gráfica de Scatchard para la unión de [³H]PDBu a z-chimaerin.

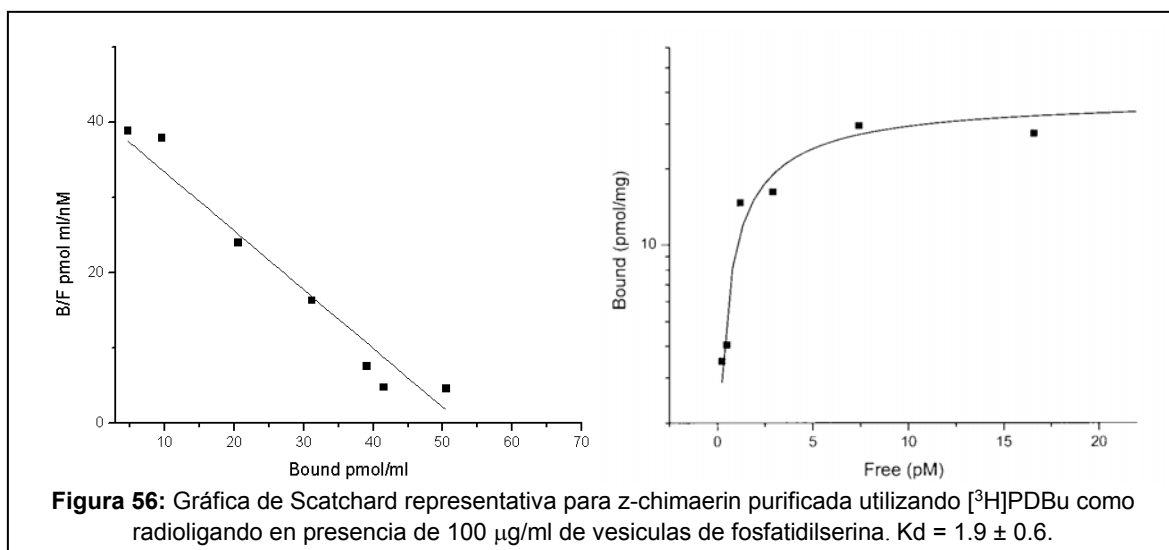
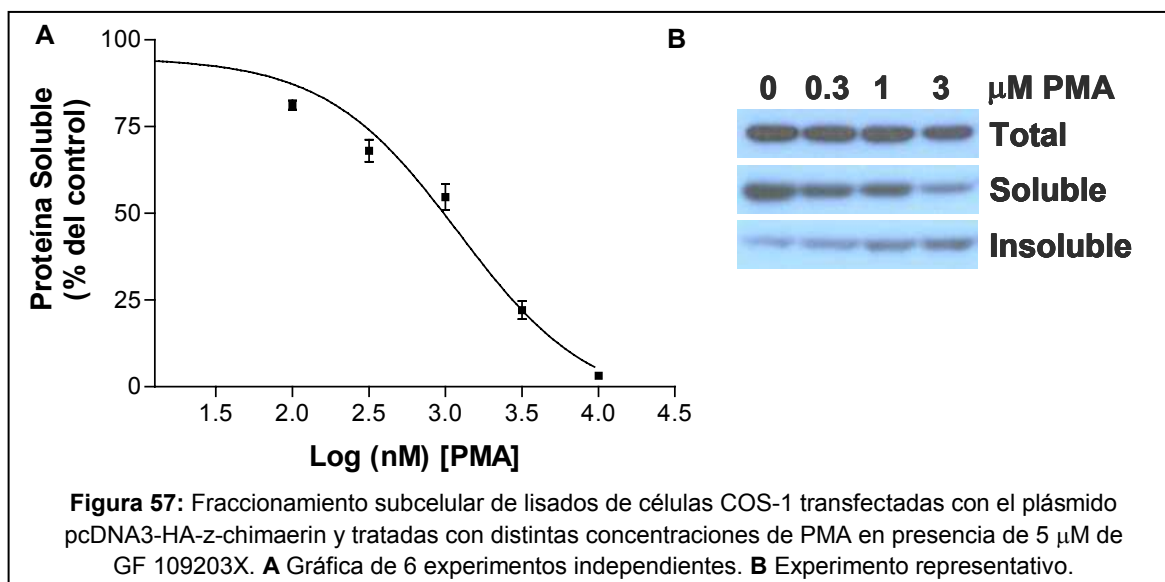


Figura 56: Gráfica de Scatchard representativa para z-chimaerin purificada utilizando [³H]PDBu como radioligando en presencia de 100 µg/ml de vesículas de fosfatidilserina. Kd = 1.9 ± 0.6.

d. Translocación de z-chimaerin en respuesta a PMA

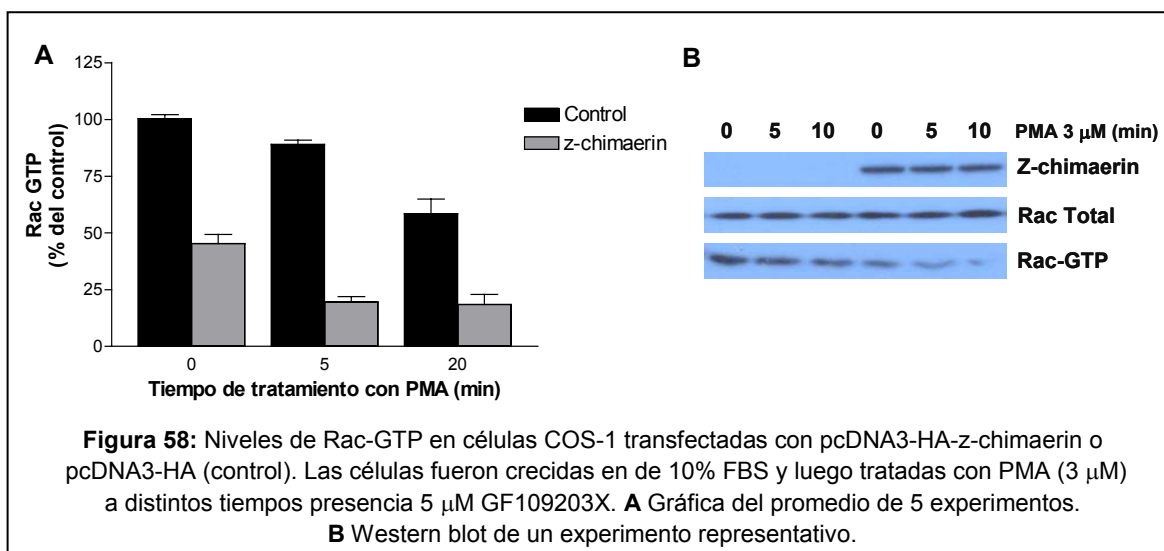
Para estudiar si z-chimaerin responde a ésteres de forbol en células, se analizó la translocación de ésta en respuesta a PMA en células COS-1 transfectadas con la construcción pCDNA3-HA-z-chimaerin (Figura 53). Luego de 48 horas de transfectadas, las células fueron tratadas con distintas concentraciones de PMA durante 20 minutos en presencia de 5 μM del inhibidor de PKCs GF109203X. La figura 57 muestra un experimento representativo y la gráfica del promedio de 6 experimentos independientes. Como se puede apreciar, z-chimaerin responde a concentraciones similares de PMA que $\beta 2$ -chimaerin (Figura 27), con un EC_{50} de 1,2 μM . Esto apoya la idea de que, al igual que $\beta 2$ -chimaerin, z-chimaerin se encuentra auto-inhibida, con el dominio C1 enterrado en la estructura terciaria (Figura 52), lo que explica las diferencias entre la afinidad *in vitro* y en células.



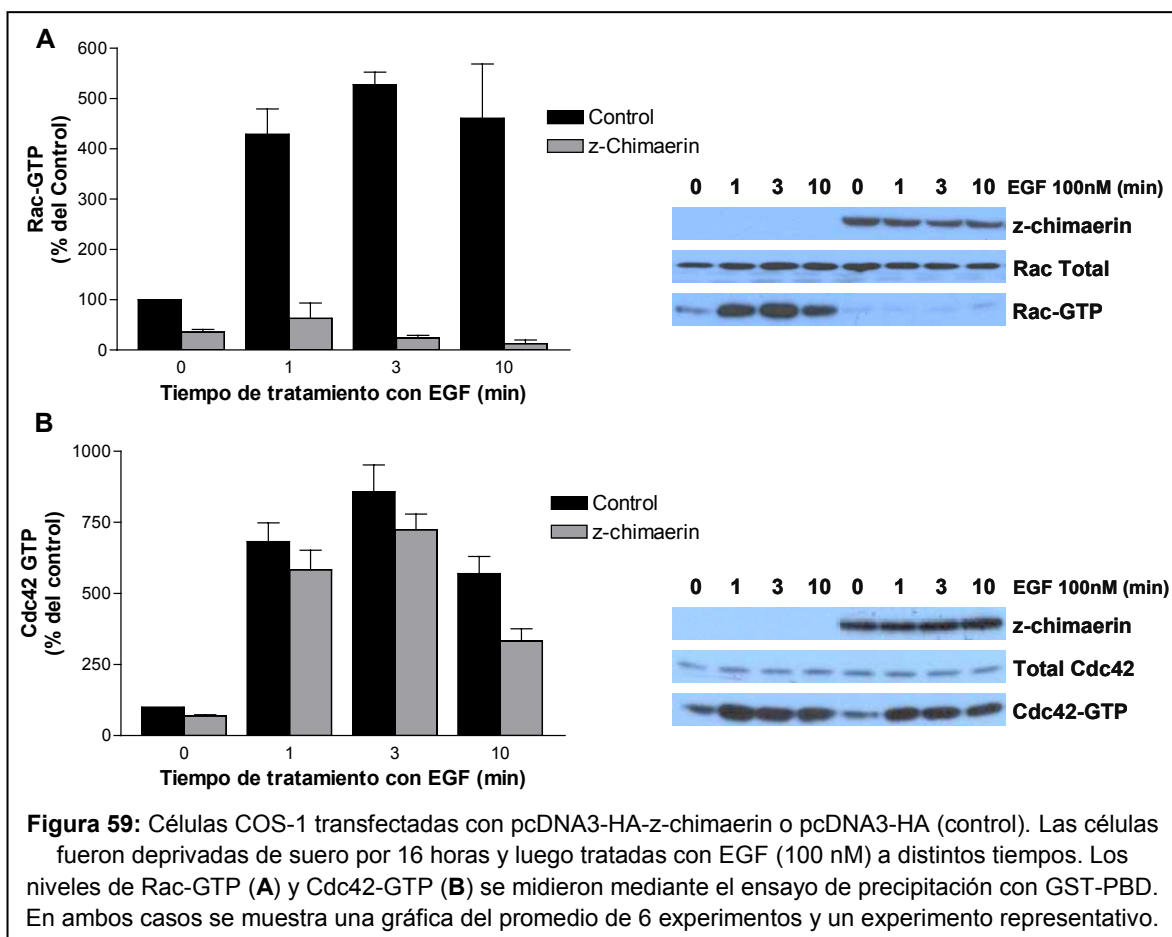
e. z-chimaerin tiene actividad de Rac-GAP

Para evaluar la actividad de GAP de z-chimaerin, células COS-1 fueron transfectadas con pCDNA3-HA-z-chimaerin o el plásmido vacío como control. Tras 48 horas de incubación, las células fueron tratadas o no a distintos tiempos con PMA (3 μM) en presencia de GF109203X (5 μM). Estas células se lisaron y se midieron los niveles de Rac-GTP utilizando el ensayo de precipitación con GST-PBD (ver Métodos). Como se ve en la

figura 58, la sobreexpresión de z-chimaerin en células creciendo en presencia de suero causa una disminución de los niveles de Rac-GTP respecto de células control. El tratamiento con PMA en presencia de GF109203X causa una disminución de los niveles de Rac-GTP en células control por la presencia de quimerinas endógenas. Esta disminución en respuesta al tratamiento con PMA se ve acentuada por la sobreexpresión de z-chimaerin.



En células COS-1, cuando se las estimula con EGF, β 2-chimaerin se transloca a la membrana plasmática e interactúa con Rac, inactivándola. Esta translocación es dependiente de la producción de DAG por PLC γ y puede ser bloqueada utilizando inhibidores específicos de PLC γ o bloqueando la expresión de esta enzima por medio de siRNA [178]. En la figura 59 se muestra un experimento donde células COS-1 transfectadas con z-chimaerin o plásmido control fueron tratadas con 100 nM de EGF a distintos tiempos. Como se puede apreciar en la figura 59A, la sobreexpresión de z-chimaerin inhibe la activación de Rac luego del tratamiento con EGF. Para evaluar la especificidad de z-chimaerin como Rac-GAP, se midieron los niveles de activación de Cdc42 luego del tratamiento con EGF en células sobre expresando z-chimaerin y células control. Como se muestra en la figura 59B z-chimaerin afecta sólo mínimamente los niveles de Cdc42-GTP tras el tratamiento con EGF.



V.3 Conclusiones

Hemos identificado y clonado la quimerina del pez cebra. Esta nueva isoforma, a la que llamamos z-chimaerin, tiene un 74% de identidad con $\alpha 2$ -chimaerin y un 65% de identidad con $\beta 2$ -chimaerin y fue reportada en la base de datos del NCBI bajo el número de acceso AY684586. Este gen mapea en el cromosoma 21 del pez cebra, en una región cuya secuencia no ha sido completamente ordenada aún. Además de este gen, no se ha encontrado ningún otro gen que codifique para otra isoforma de chimaerin en esta especie, con lo cual podemos afirmar que en este organismo existe un solo gen.

Encontramos expresión de z-chimaerin en lisados de cerebro, testículo y piel de peces adultos, y se encontraron diferencias en la corrida electroforética en los distintos tejidos. Una explicación es que existan distintas isoformas codificadas por el mismo gen como es el caso del gen CHN2 de humanos descrito en el capítulo primero. En testículo encontramos una proteína de 35 kD que se corresponde con las isoformas 1 de mamíferos. En cualquier caso, la isoforma clonada originalmente de ADN copia de cerebro muestra 100% identidad de secuencia con la encontrada en ovarios (RNA mensajero de origen materno). Se ha detectado la presencia de la proteína y del mensajero desde los primeros estadios del desarrollo, lo cual indica que el ARNm de z-chimaerin es de origen materno. A las 24 hpf la expresión se hace más evidente en tejido nervioso, y a los 5 días post fertilización se detectan altos niveles del mensajero en cerebro, hígado, páncreas y tubo digestivo.

Ensayos *in vitro* de unión a ligando utilizando z-chimaerin recombinante indicaron que ésta posee una afinidad por los ésteres de forbol similar a la de las PKCs y las isoformas de quimerinas de mamíferos, con una Kd aproximada de 2 nM. En ensayos de translocación a membrana en células COS-1, z-chimaerin se transloca en respuesta a PMA, con un EC_{50} de 1,2 μ M. Esto apoya la idea de que, al igual que $\beta 2$ -chimaerin, z-chimaerin se encuentra auto-inhibida, con el dominio C1 enterrado en la estructura terciaria, como indica el modelado de la figura 52.

VII- Capítulo Quinto

**Estudio de la función de quimerinas
durante el desarrollo embrionario
temprano en el pez cebra (zebrafish)**

En el capítulo IV se mostró el clonado del único gen de quimerinas presente en el pez cebra. La caracterización bioquímica de z-chimaerin mostró que posee características similares a las quimerinas de mamíferos. Esto junto con las bondades del pez cebra como modelo para el estudio del desarrollo embriológico hacen que este sistema sea único para el estudio de la función biológica de las quimerinas *in vivo*. En este capítulo se analizará la función de z-chimaerin durante el desarrollo embrionario.

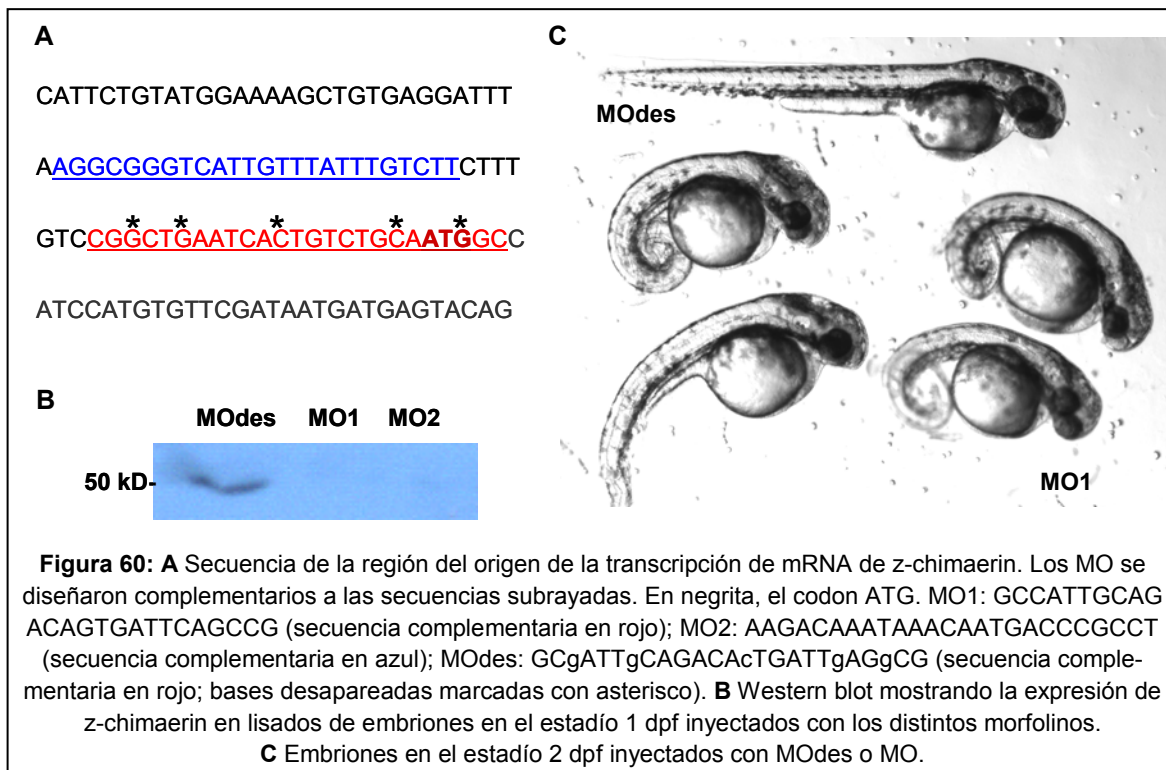
VII.1 Objetivos:

- Apagar la expresión de z-chimaerin utilizando oligonucleótidos morfolínicos antisentido.
- Clonar la proteína homóloga a Rac1 en zebrafish y analizar el efecto que tiene la alteración de la expresión de z-chimaerin en sus niveles de activación.
- Caracterizar el fenotipo de los embriones *knock-down* para z-chimaerin.
- Entender los mecanismos de acción de las quimerinas en el contexto de un organismo vivo.

VII. 2 Resultados:

a. z-chimaerin regula la actividad de Rac in vivo durante el desarrollo embrionario

Para evaluar la función de z-chimaerin durante el desarrollo embrionario, se diseñaron oligonucleótidos morfolínicos (morfolinos, MO) complementarios a la zona de inicio de la transcripción del mensajero que codifica para z-chimaerin con el fin de apagar su expresión. Como se indica en la figura V.1A, se diseñaron dos oligonucleótidos diferentes contra la zona 5' no codificante inmediatamente 5' del codón ATG del comienzo de la traducción. Como control se diseñó un morfolino con 4 bases desapareadas (MOdes) (Figura 60) [169].

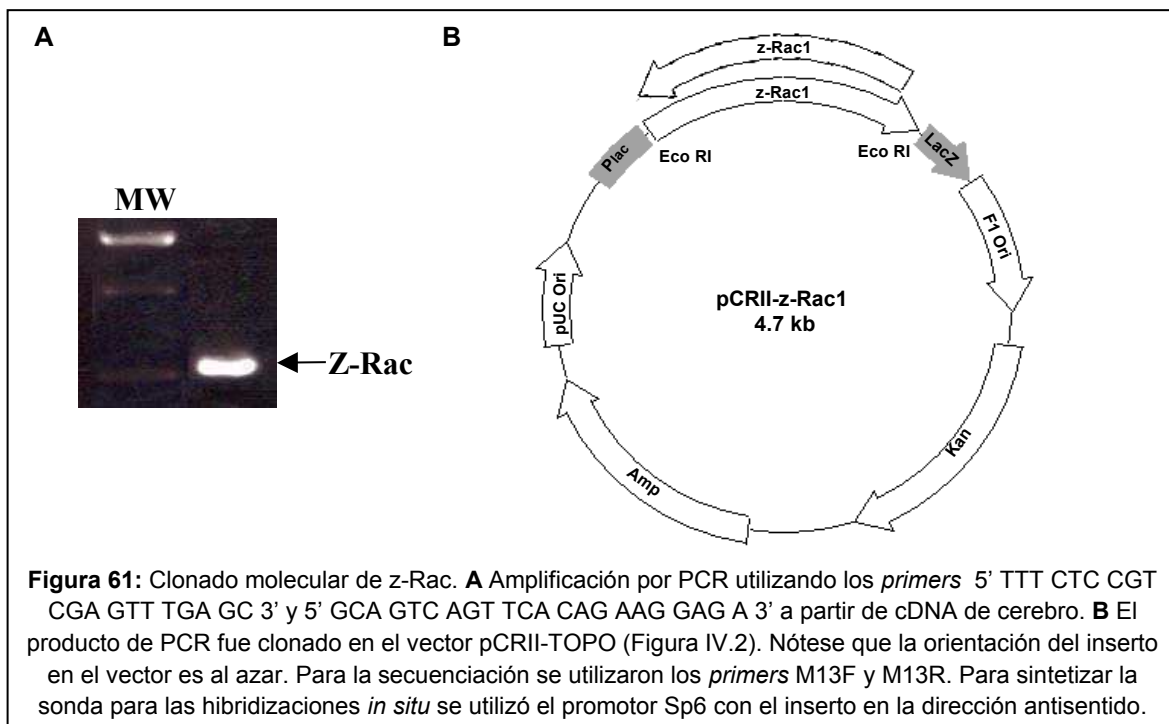


La microinyección de 1 ng de cada uno de los MOs contra z-chimaerin causó una reducción en los niveles de z-chimaerin en embriones a las 20 hpf, comparado con embriones *wild type* (wt) o inyectados con MOdes (Figura 60B). El silenciamiento de la expresión (*knock-down*) de z-chimaerin provoca un fuerte fenotipo llamativo que se evidencia durante el periodo de somitogénesis. A las 24 hpf los embriones *knock-down*

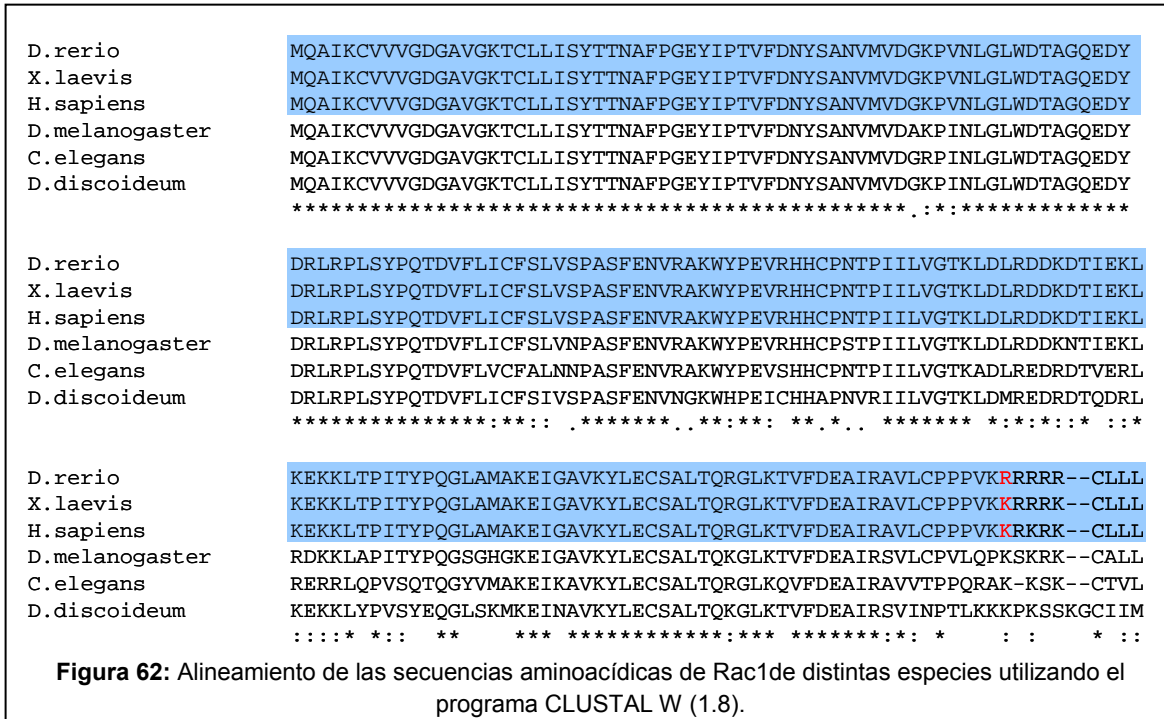
carecen de la extensión del saco vitelino (*yolk extension* o YE), presentan la notocorda desviada, la cola curvada y las somitas tienen forma irregular (Figura 60C). Entre otros defectos más generales y tardíos que se observan podemos citar: el desarrollo de edemas de corazón, fallas para inflar la vejiga natatoria, y problemas motores. Estas características fenotípicas sugieren defectos tempranos. Los embriones *knock-down* no sobreviven mas allá de los 4 dpf. Estos resultados muestran que z-chimaerin es esencial para el correcto desarrollo embrionario en el pez cebra.

b. Clonado de la proteína Rac1 de zebrafish

Como se mostró en el capítulo IV, z-chimaerin es un GAP específico para Rac. Para estudiar si las causas que originan el fenotipo que se observa en embriones *knock down* (kd) para z-chimaerin son dependientes de la actividad de Rac, se clonó la proteína Rac1 de zebrafish. La estrategia para el clonado de la misma fue idéntica a la que se utilizó para el clonado de z-chimaerin. A partir de ADN copia de cerebro, se amplificó por PCR con *primers* diseñados a partir de secuencias de ESTs la secuencia que codifica para z-Rac1. La figura 61 muestra la estrategia utilizada para el de clonado de z-Rac1.

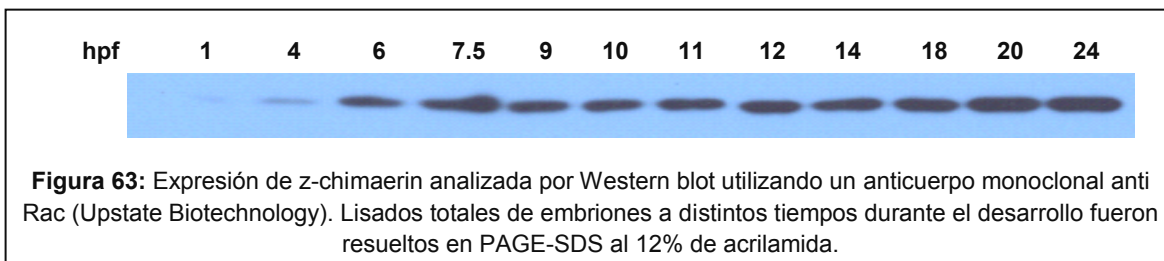


La secuencia de z-Rac1 se muestra en el Anexo, y fue reportada en el *Gene Bank* bajo con el numero de acceso AY682791. Esta proteína es 99% idéntica a la de humanos y *Xenopus*, y comparte una alta identidad de secuencia con su homóloga en *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Dictyostelium discoideum* (Figura 62).

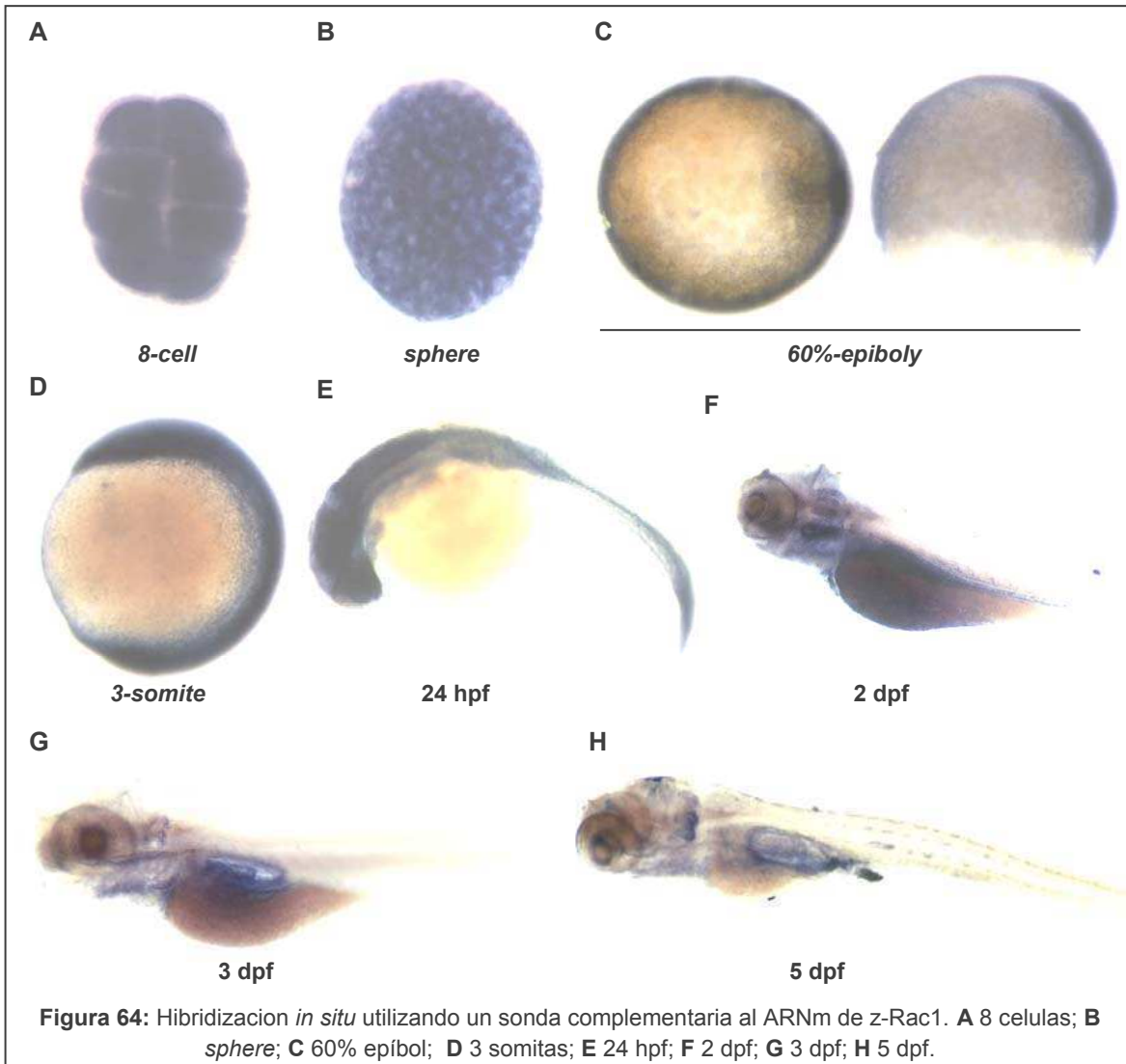


c. Expresión de z-Rac1 durante el desarrollo embrionario

Se analizó el patrón de expresión de z-Rac durante el desarrollo embrionario mediante Western blot e hibridización *in situ*. Para el Western blot, se analizó la presencia de z-Rac en lisados totales de embriones en distintos estadios utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Rac (Upstate Biotechnology). Como se muestra en la figura 63, se detectó la presencia de proteína desde los primeros estadios del desarrollo.



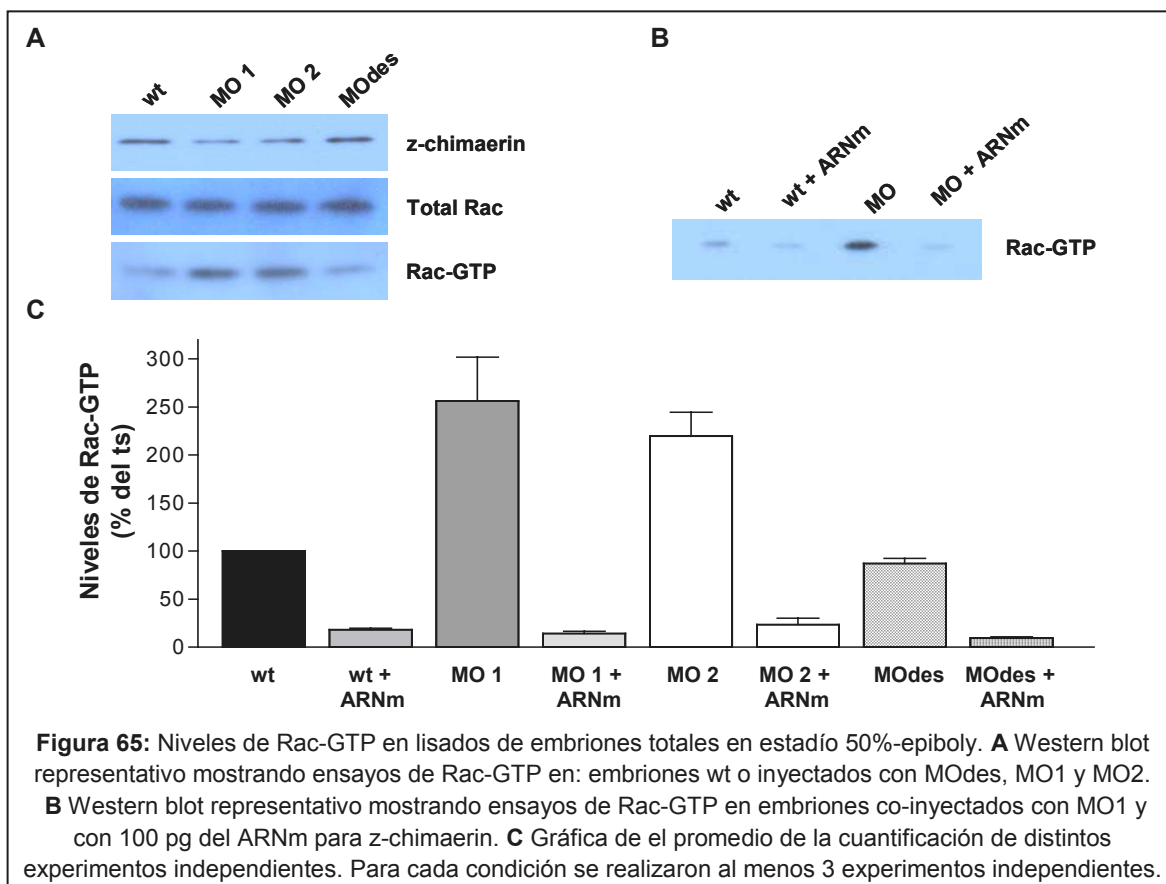
Para confirmar este resultado, se realizaron hibridizaciones *in situ* en embriones en distintos estadios utilizando una sonda complementaria para el mensajero que codifica para z-Rac. La figura 64 muestra la presencia del ARNm en embriones en distintos estadios del desarrollo embrionario, lo cual confirma que z-Rac también se expresa de forma materna.



d. z-chimaerin regula a zRac1 durante el desarrollo embrionario

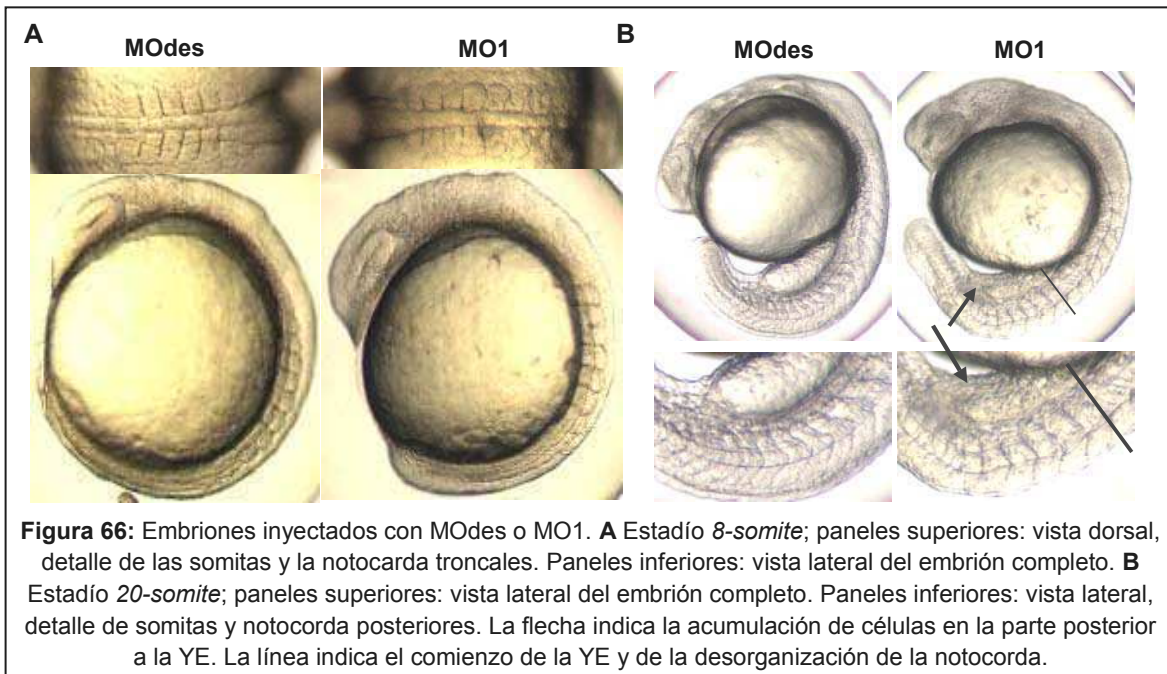
El hecho de que ambas proteínas se encuentren expresadas en el mismo momento, sugiere un papel importante de z-chimaerin en la regulación de z-Rac1. Para poner a prueba esta hipótesis, se realizaron ensayos para medir los niveles de Rac-GTP en embriones donde se apagó la expresión de z-chimaerin o se la sobreexpresó. Para ello se micro-inyectaron

embriones en estadio de una célula, con los distintos morfolinolinos contra chimaerin o el control desapareado y con el ARN mensajero (ARNm) codificante para chimaerin (más adelante se detallará la obtención de ARNm) o combinación de ambos. En los casos en que se co-inyectó MO y ARNm, las inyecciones se realizaron por separado, inyectando siempre en primer lugar el MO, y luego el ARNm. Los ensayos se realizaron utilizando 40 embriones por tratamiento en el estadio de 50% epíboli como se detalla en métodos. Como se muestra en la figura 65, el silenciamiento de la expresión de z-chimaerin en embriones, aumenta los niveles de Rac-GTP. Este aumento en los niveles de activación de Rac puede ser revertido por la sobreexpresión de z-chimaerin a través de la microinyección de ARNm. Estos resultados demuestran que z-chimaerin regula los niveles de activación de Rac *in vivo*, y que esta regulación es necesaria para el correcto desarrollo del embrión.



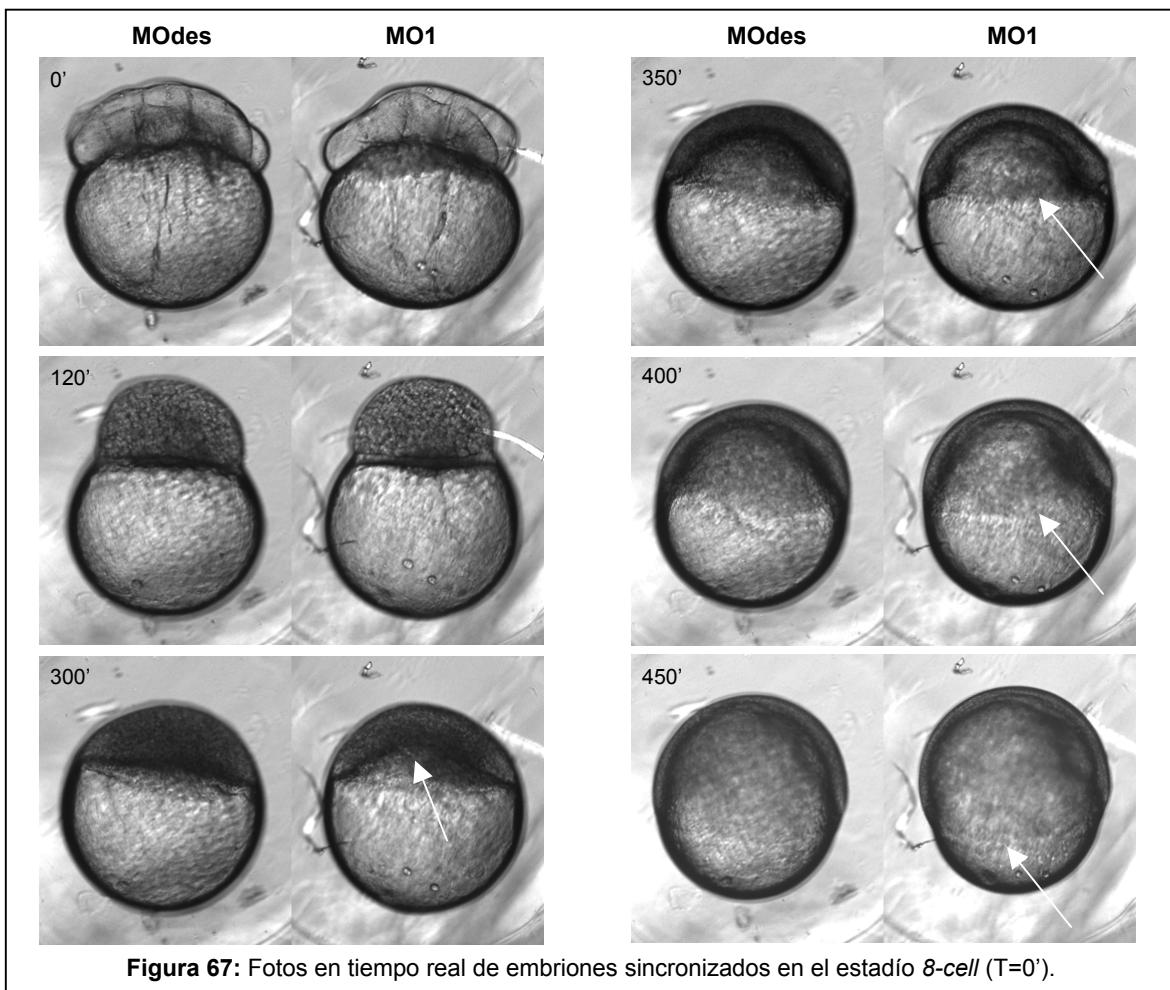
e. z-chimaerin es esencial durante el desarrollo embrionario

Como se vio en la figura 60 los embriones *knock-down* para *z-chimaerin* presentan defectos en la notocorda posterior y en la extensión del saco vitelino. La figura 66A muestra que en embriones *knock-down* en el estadio de 8 somitas las somitas tienen forma redondeada y el eje es más angosto en comparación con embriones control. Esta característica fenotípica se asemeja a la de los mutantes *dino* y *mercedes* [192]. En estos mutantes el fenotipo se debe a defectos en la migración de células laterales hacia el eje dorsal. Este defecto en la convergencia lateral produce que un menor número de células alcance el eje dorsal. En el estadio de 20 somitas se ve que los embriones *knock-down* tienen defectos en la YE y la notocorda desorganizada a partir de la parte dorsal a la YE (Figura 66B; la línea indica el comienzo de la YE y el de la desorganización de la notocorda). Además se puede ver una acumulación de células en la parte posterior a la YE (flecha en figura 66B). Esta acumulación de células es consistente con el menor número de células en el eje dorsal, sugiriendo que los embriones *knock-down* tienen defectos en la distribución de las células a lo largo del eje antero-posterior durante la gastrulación.

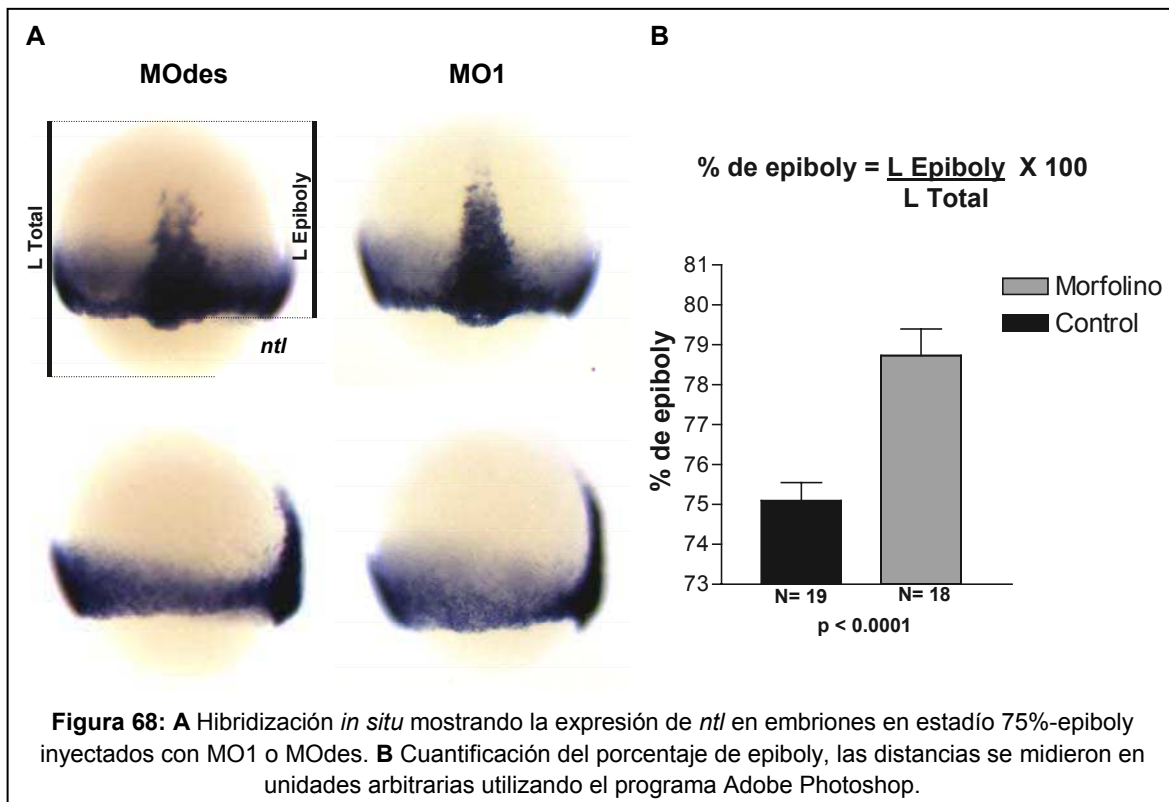


f. El movimiento de epiboli progresa más rápido en los embriones “knock-down”

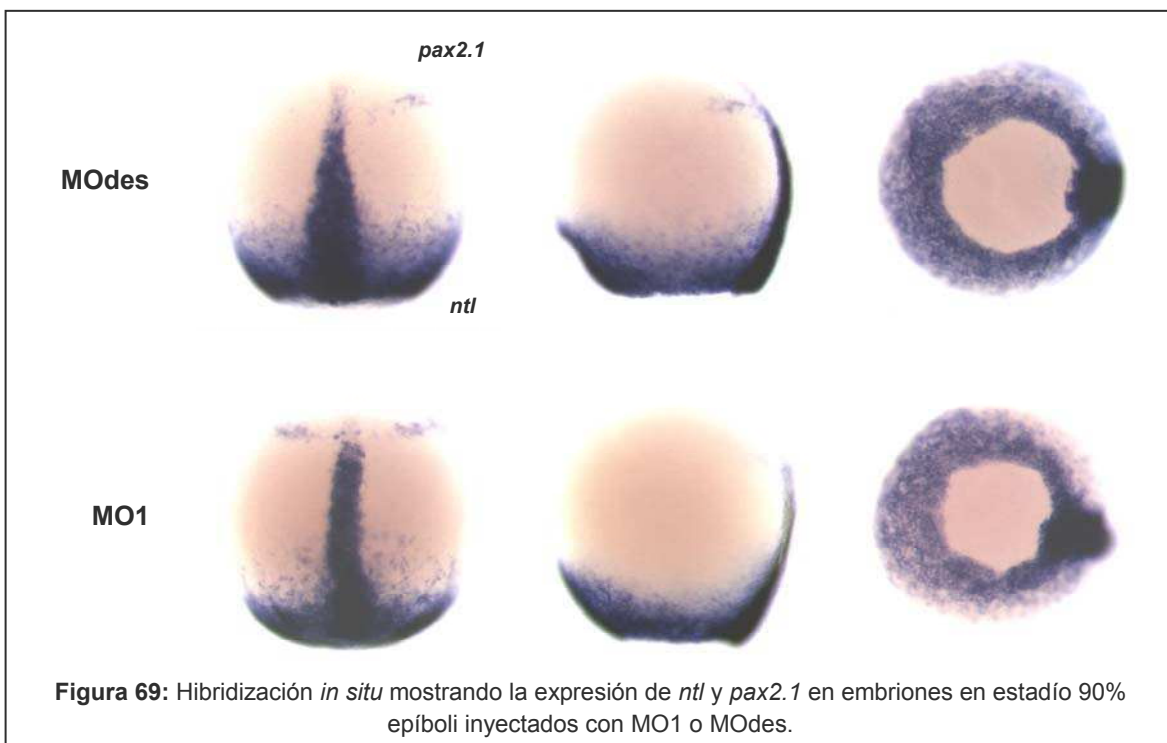
Para analizar en más detalle el movimiento celular durante el período de gastrulación, se realizaron películas en tiempo real de embriones control y *knock-down*. Estas películas se realizaron sacando fotos cada 5 minutos a embriones hermanos inyectados con morfolino contra z-chimaerin o morfolino desapareado. Los embriones fueron removidos del corion tras inyectarlos, y fijados en un soporte de medio E3 con 2% de agarosa. Los embriones inyectados con el morfolino contra z-chimaerin muestran una mayor velocidad en el movimiento de invaginación y epiboli hasta alcanzar 85-90% de epiboli, donde el cerrado del poro al completar epiboli se retrasa respecto de los controles. En la figura 67 se muestran fotos a distintos tiempos de una película donde se pueden apreciar dos embriones representativos.



Para verificar que el proceso de epíboli ocurre mas deprisa en los embriones *knock-down*, embriones hermanos fueron inyectados al mismo tiempo con MOdes o MO1. Estos embriones fueron sincronizados en estadio *high*, e incubados a 28 °C hasta que embriones hermanos sin inyectar alcanzaron el 75% de epíboli. Los embriones fueron fijados y en ellos se analizó por hibridización *in situ* la expresión del marcador de mesodermo *no-tail* (*ntl*). Como se ve en la figura 68A *ntl* se expresa en el margen del blastodermo, y en el eje dorsal (mesodermo axial) [193]. El porcentaje de epíboli se refiere a la fracción del embrión cubierto por el blastodermo, y se calculó midiendo la distancia que avanzó el margen del blastodermo, visualizado con *ntl*, sobre el largo total del embrión. En la gráfica de la figura 68B se muestra el promedio de la cuantificación de varios embriones. Como se puede observar en los embriones inyectados con MO el proceso de epíboli ocurre más rápido que en los controles. Estos resultados sugieren que la ausencia de z-chimaerin y el consecuente aumento en la actividad de z-Rac aceleran el proceso de epíboli.



La expresión del gen *Paired Box Gene 2a* (*pax 2.1*) en la región limitada por el cerebro medio y por el cerebro posterior (MHB por *midbrain-hindbrain boundary*) puede ser utilizada como reloj molecular [194]. Este marcador comienza a expresarse en embriones *wild type* alrededor del estadio 90% de epíboli. En la figura 69 se muestra que embriones *knock-down* están más avanzados en epíboli respecto de los embriones control al momento de la activación de la expresión de *pax 2.1*. Esto confirma que en embriones donde la expresión de *z-chimaerin* ha sido apagada el movimiento de epíboli progresa más rápidamente que en embriones control.



g. El apagado de la expresión de z-chimaerin no afecta el “patterning”

El hecho de que el proceso de epíboli ocurra más rápido en los embriones *knock down* produce un desbalance en el movimiento de las células en el embrión, acumulando células en la zona de la yema caudal (*tail-bud* o TB), lo cual lleva a que una menor cantidad de células llegue a convergir al eje dorsal, como se vio en la figura 66. La yema caudal está poblada normalmente por células provenientes de una región conocida como zona de no-convergencia (NCZ por *Non Convergence-extension Zone*). La NCZ está representada por

células que se encuentran más allá de los 90° del eje dorsal. Mutantes con NCZ más grandes que lo normal, como es el caso de *dino*, presentan fenotipos ventralizados [192], mientras que mutantes con NCZ más pequeñas están dorzalizados [195]. Como ocurre con *dino*, en embriones donde el proceso de epiboli ocurre más deprisa la NCZ también estaría expandida, afectando el destino celular. Sin embargo, a diferencia de mutantes con fenotipos ventralizados, la expansión de la NCZ no se debería a cambios en el patrón de expresión de genes, sino a cambios en el movimiento de las células. Para verificar que la planificación corporal (*patterning*) en los embriones *knock-down* no se encuentra afectada, se analizó por hibridización *in situ* la expresión de distintos genes utilizados como marcadores.

En la figura 70A se muestra que la expresión de *bmp4* (*bone morphogenic protein 4*) en el estadio *shield* no está afectada en los embriones *knock-down*. Este marcador se expresa ventralmente en la NCZ [196]. El gen *sonic hedgehog* (*shh*) se expresa en el organizador, y es utilizado como marcador de células dorsales, mientras que *eve* se expresa en la NCZ y es utilizado como un marcador ventral. La figura 70B muestra que la expresión de estos marcadores no está afectada en el estadio *shield* en los embriones donde se apagó la expresión de z-chimaerin.

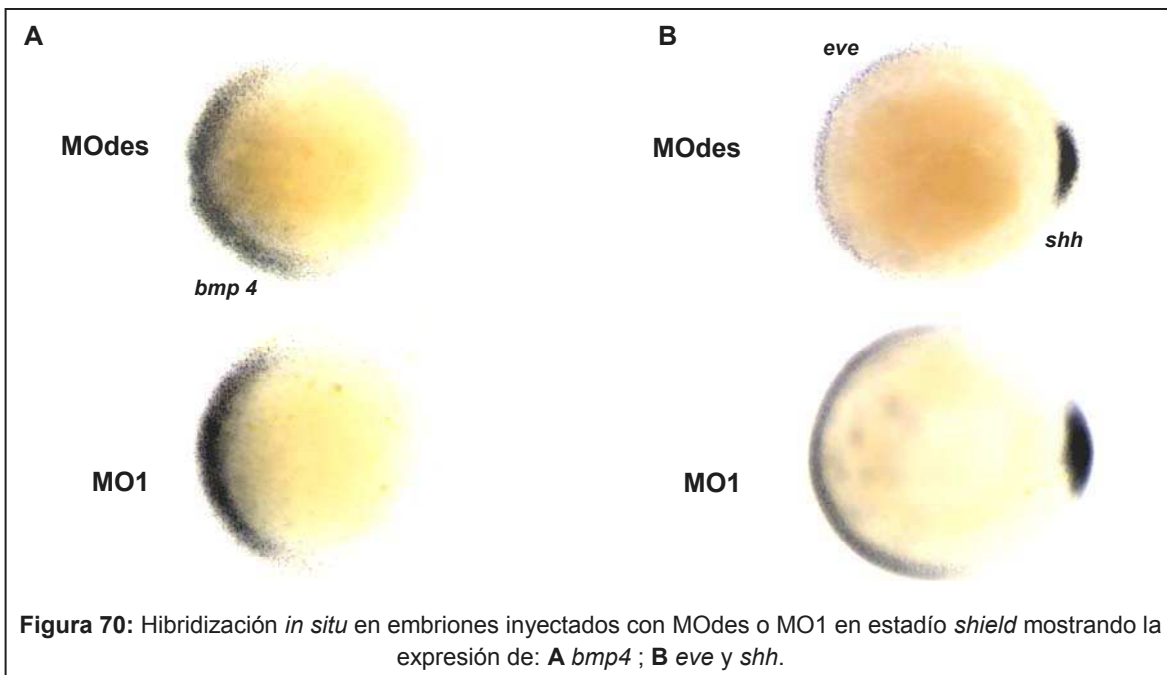
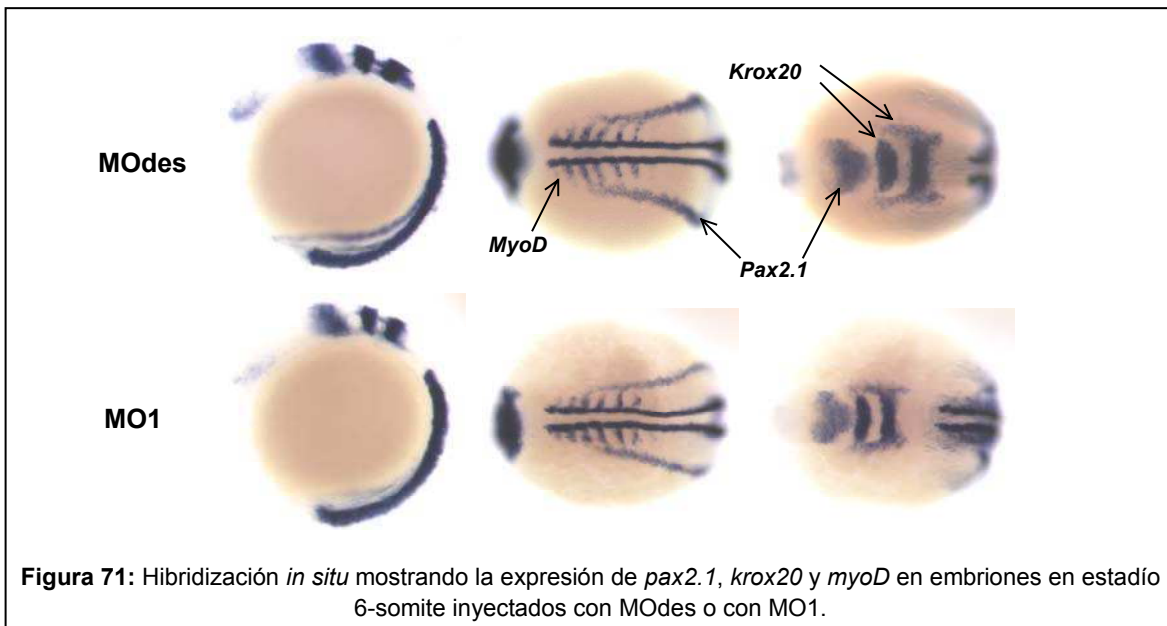


Figura 70: Hibridización *in situ* en embriones inyectados con MOdes o MO1 en estadio *shield* mostrando la expresión de: **A** *bmp4* ; **B** *eve* y *shh*.

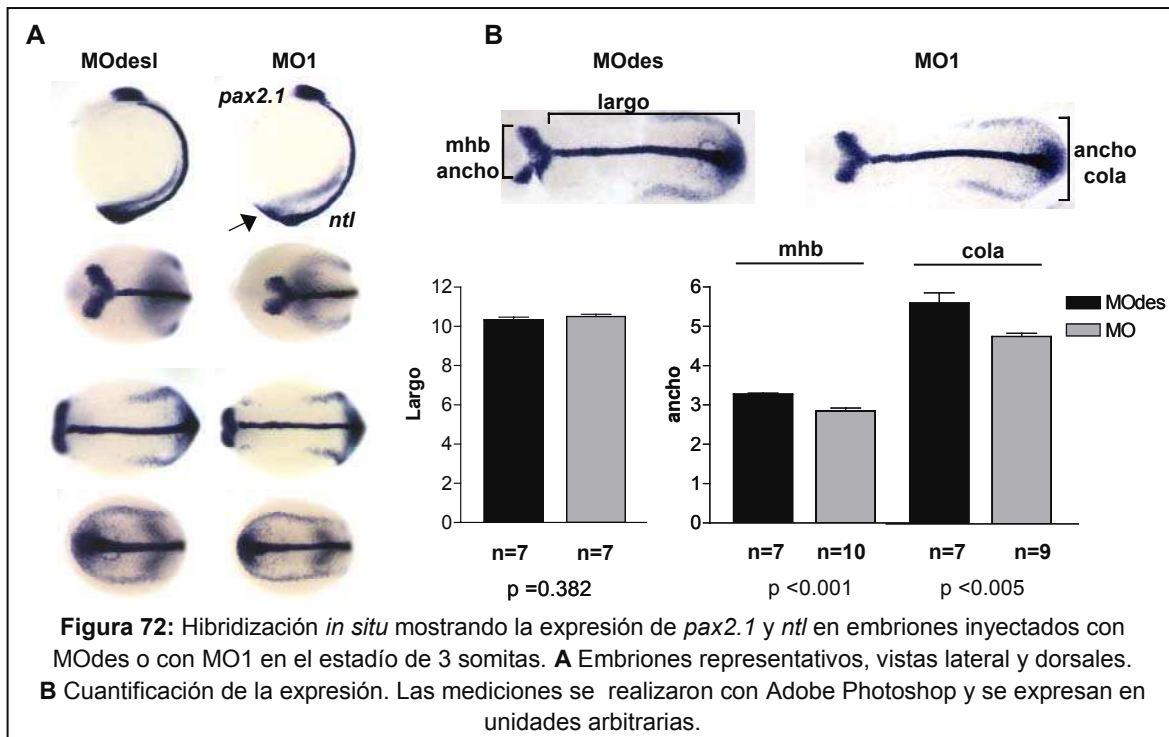
En la figura 71 se muestra la expresión de los marcadores *Myogenic Differentiation* (*myoD*), *Early Growth Response 2b* (*krox20*) y *pax2.1* en embriones en el estadio 6-somites. El gen *myoD* se expresa normalmente en las somitas y el mesodermo paraxial [197]. La expresión de *krox20* está restringida a los rombómeros 3 y 5 en el cerebro posterior [193]. El marcador *pax2.1* se expresa en la MHB y en los precursores de los pronefros [198]. En los embriones inyectados con MOdes, la expresión de estos marcadores es idéntica a la observada en embriones sin inyectar (dato no mostrado). En los embriones donde la expresión de z-chimaerin fue silenciada por medio de la inyección MO1, se ve una correcta expresión de los marcadores. El hecho de que estos genes se expresen de forma correcta indica que la falta de z-chimaerin no afecta el destino celular ni el diseño del plano corporal. La mayor diferencia observada en estos embriones es que el eje ántero-posterior es más angosto que en los embriones control.



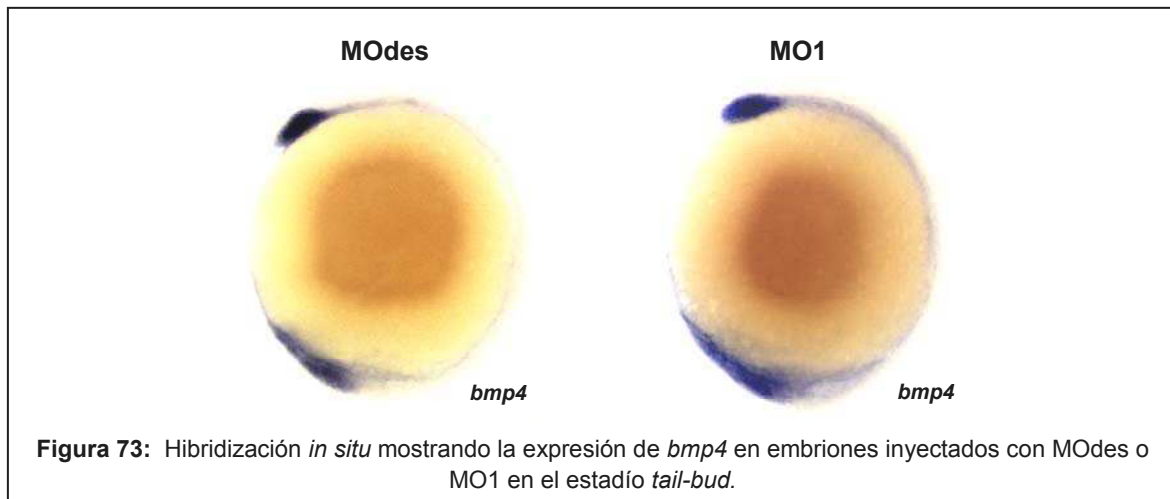
h. Los embriones “knock-down” están “posteriorizados”

Para cuantificar esta observación, se analizó la expresión de los marcadores *ntl* y *pax2.1* en embriones en estadio de 3 somitas. En la figura 72A se puede ver el patrón de expresión de estos genes. En los embriones *knock-down* se observa, además de una acumulación de células en el TB (flecha), que el eje dorsal es más angosto. Para cuantificar

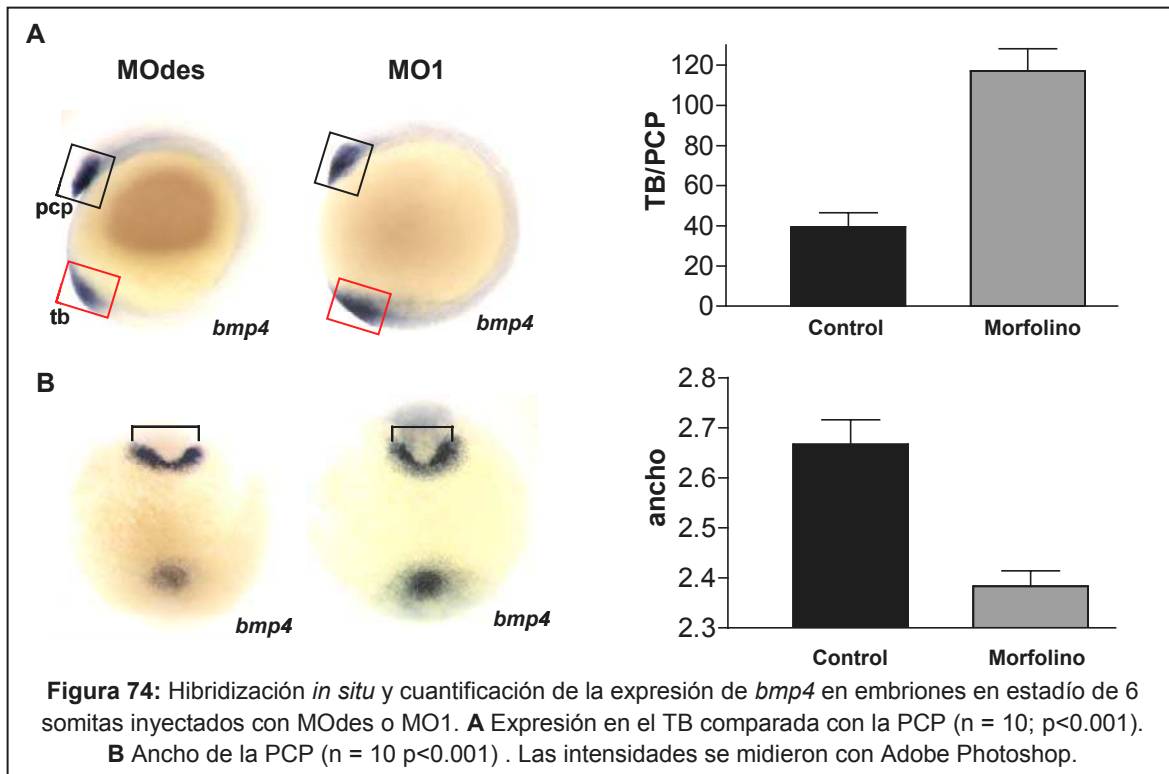
esta observación se midieron los dominios de expresión de estos genes. El resultado de esta cuantificación se muestra en el gráfico de barras de la figura 72B. Si bien no se observaron diferencias en el largo del mesodermo axial, se pudo apreciar una diferencia significativa en el ancho de la zona de expresión de *pax2.1*. Este dato es consistente con las observaciones anteriores, indicando que en los embriones inyectados con MO hay un menor número de células que alcanzan el eje dorsal acumulándose en la yema caudal.



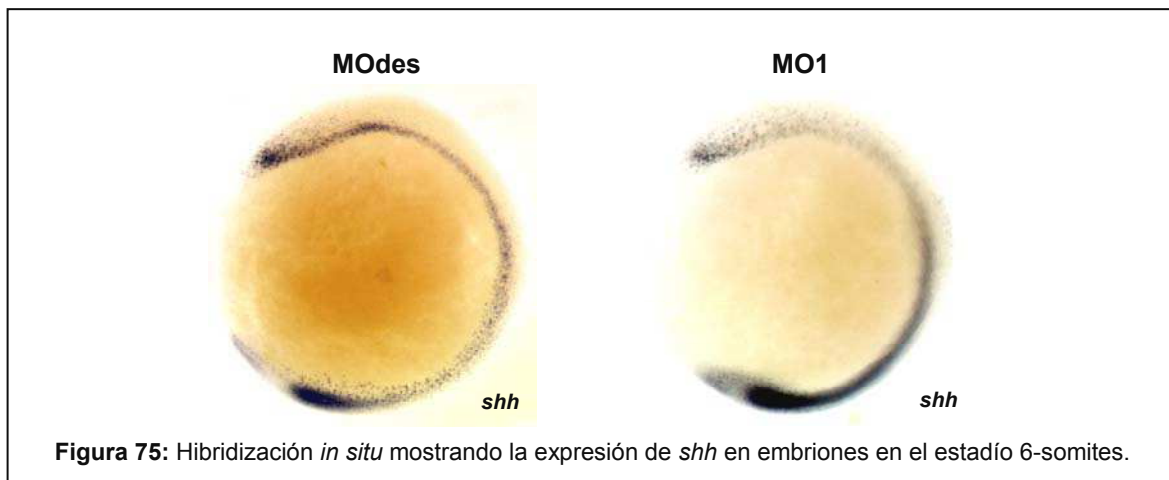
Para comprobar que las células que no alcanzan el eje dorsal se acumulan en la zona de la yema caudal, se analizó la expresión del marcador *bmp4*, que se expresa en la región ventral a ésta y en la placa precordial (PCP por *prechordial plate*) [196]. En la figura 73 se ve la expresión de *bmp4* en embriones control y *knock-down* en el estadio de *tail-bud*. Se puede ver una acumulación de células y una expansión de la expresión de *bmp4* en la zona del TB en embriones *knock-down*.



Esta expansión en la expresión de *bmp4* es similar a lo que ocurre en mutantes ventralizados. Dado que la expresión de *bmp4* y *eve* no se ve afectada en estadios anteriores, proponemos que esta expansión en la expresión de *bmp4* no se debe directamente a cambios en los destinos celulares (*cell fates*), sino que es secundario a defectos en la migración celular. Las células que no alcanzaron el eje dorsal se acumulan en el TB, exponiéndose a una zona “ventral” rica en factores morfogénicos de la familia de los *bmps*. La exposición de células a estos factores haría que estas se “ventralicen”, expresando marcadores como *bmp4*. Para cuantificar esta expansión en la expresión de *bmp4* se midió por densitometría la intensidad de la señal de *bmp4* en el TB y se la normalizó por la intensidad de la señal en la PCP en embriones en estadio de 6 somitas. La figura 74A muestra que los embriones inyectados con MO1 tienen expandida la expresión de *bmp4* en el TB. Estos embriones muestran también una disminución en el ancho de la PCP consistente con lo discutido anteriormente (Figura 74B)



Del mismo modo que las células que se acumulan en la parte ventral del TB expresan marcadores ventrales, las células que se acumulan en la parte dorsal de éste deberían tener aumentada la expresión de marcadores dorsales. Para ello se analizó la expresión del marcador *shh* en embriones en estadio de 6 somitas. Como se puede ver en la figura 75, la expresión de *shh* está expandida en el extremo posterior de los embriones *knock-down*.

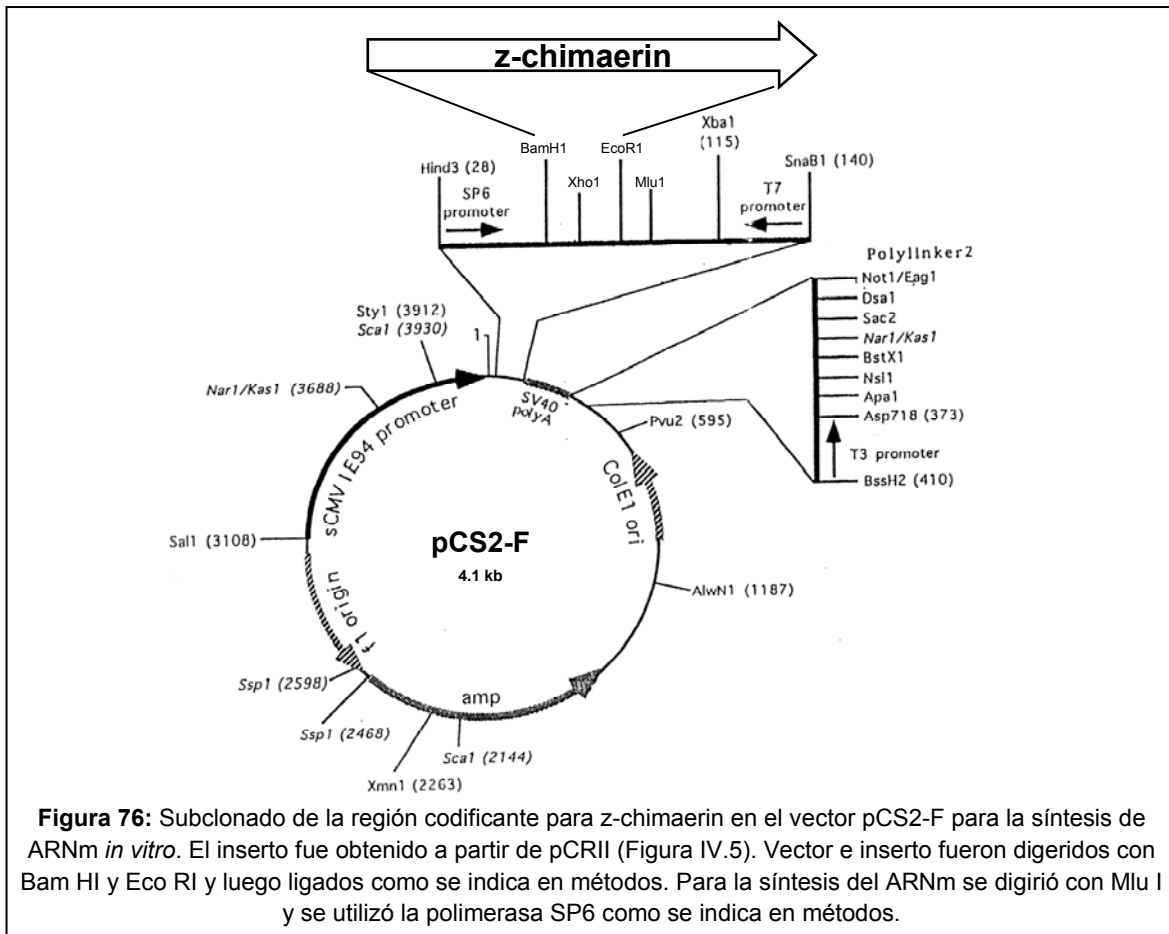


Estos resultados indican que los embriones *knock-down* para z-chimaerin presentan mayor cantidad de células en la parte posterior. Podemos decir entonces que los embriones se encuentran “posteriorizados”.

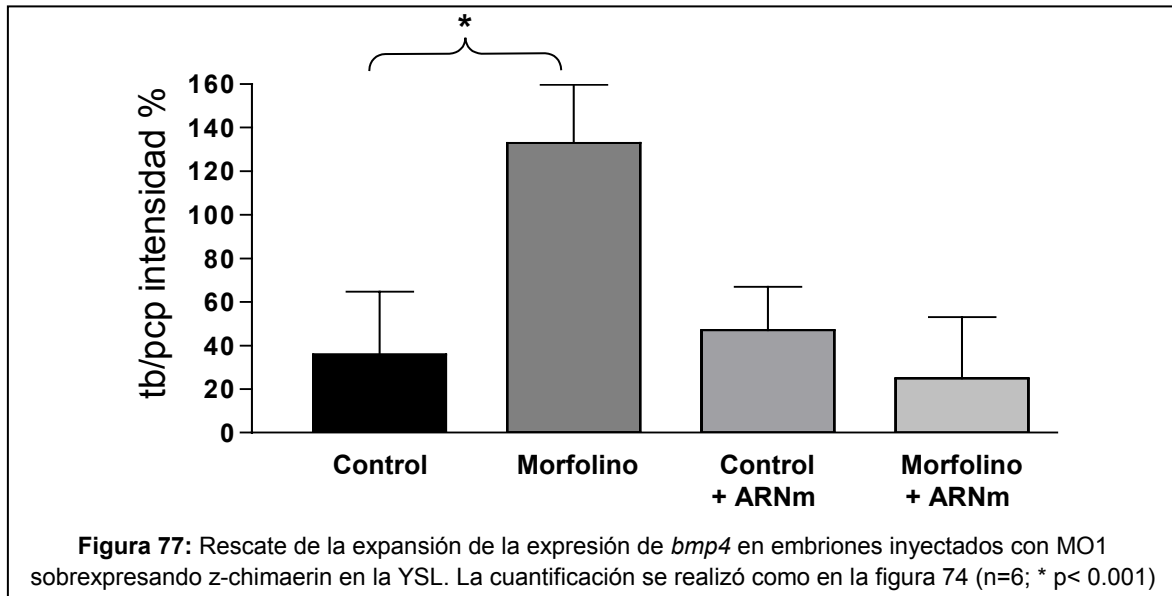
i. La actividad de GAP de z-chimaerin es necesaria en la YSL para la regulación la epíboli

Con la idea de rescatar el fenotipo en los embriones *knock-down* sobreexpresando z-chimaerin mediante la inyección de ARN mensajero (ARNm), se subclonó la región codificante de z-chimaerin en el vector pCS2-F, como se muestra en la figura 76. El ARNm fue sintetizado *in vitro* como se indica en métodos. La inyección de 100 pg de este ARNm en el estadio de una célula aumenta los niveles de z-chimaerin mas de 100 veces respecto a los niveles de embriones control. Esta sobreexpresión no causa ningún defecto fenotípico aparente y los embriones se desarrollan normalmente (dato no mostrado). Esto es consistente con el modelo de activación por lípidos propuesto en el capítulo segundo donde se propuso que z-chimaerin estaría inactiva en el citoplasma y necesitaría de la interacción con DAG y fosfolípidos de membrana para producir el cambio conformacional para su activación. Lo sorprendente fue encontrar que en embriones *knock-down*, la sobreexpresión de z-chimaerin no era suficiente para rescatar el fenotipo (dato no mostrado).

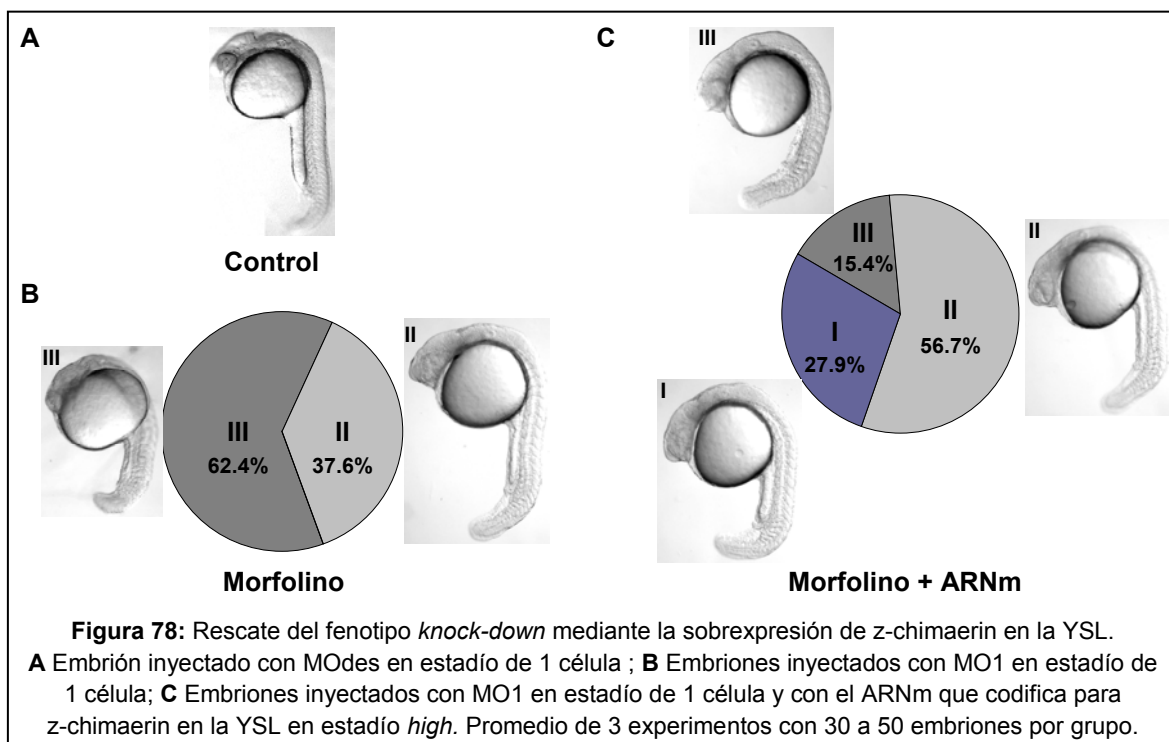
Es de suponer que cuando se inyecta ARNm en el estadio de 1 célula, éste y su producto, la proteína madura, se distribuyen de forma equitativa entre los blastocistos en las sucesivas divisiones. Distintos factores pueden invalidar esta suposición, entre ellos, la estabilidad de la proteína y del mensajero en los distintos tipos celulares, o la distribución desigual de éstos durante la división y diferenciación celular. El primer evento de diferenciación celular se produce en el estadio *high* donde se forma la capa envoltoria (*enveloping layer* o EVL) y la capa del sincitio del saco vitelino (*yolk syncytial layer* o YSL). Los experimentos realizados con las SUPER-chimaerins en el capítulo segundo, donde se ve que los niveles de expresión de estas mutantes guardan una correlación inversa con su actividad, sugieren que las quimerinas en su estado activo serían degradadas mas rápidamente. Un mayor recambio (*turnover*) de la proteína en la región donde está siendo activada podría explicar la falta de efecto de la inyección ARNm en el estadio de una célula sobre el fenotipo *knock-down*.



Si bien hay muy pocos reportes sobre el papel de la YSL en epíboli, hay indicios de que es una importante fuente de tracción y soporte del blastodermo. Se ha propuesto que en la YSL los microtúbulos, la endocitosis y el reciclado de los excesos de membrana plasmática acumulada durante el movimiento, y la existencia de un anillo de actina contráctil, serían los que proporcionan la fuerza necesaria para este movimiento. [194] Todos estos mecanismos podrían estar regulados por Rac y por lo tanto por z-chimaerin. Para rescatar el fenotipo en embriones *knock-down*, se sobrexpresó z-chimaerin directamente en la YSL como se indica en métodos. Los embriones *knock-down* inyectados con 50 pg de RNAm en la YSL en el estadio *high* mostraron niveles normales de *bmp4* en el TB en el estadio de 6 somitas (Figura 77).

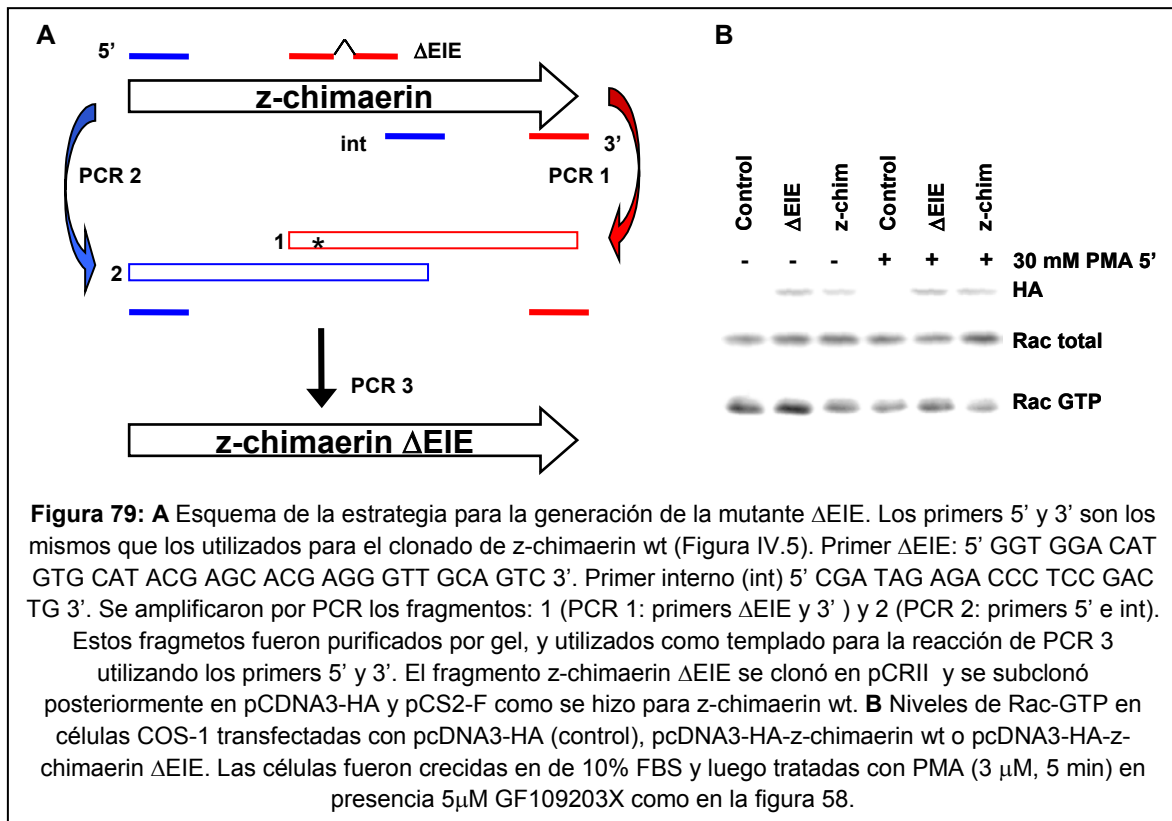


Los embriones *knock-down* inyectados con ARNm en la YSL mostraron a las 24 hpf una mejoría parcial del fenotipo. Para cuantificar el rescate del fenotipo mediante la inyección de ARNm se procedió a categorizar los embriones en 3 clases según la penetrancia del fenotipo en la YE y la notocorda. Los embriones de clase III muestran ausencia de YE y una notocorda posterior desorganizada. Aproximadamente el 60% de los embriones inyectados con MO1 pertenecen a esta categoría (Figura 78B). Los embriones de clase II muestran un fenotipo intermedio, con la YE reducida y una notocorda que puede o no estar afectada (Figura 78B). El 40% restante de los embriones *knock-down* definen a este grupo. Los embriones de clase I muestran una YE de apariencia normal y la notocorda correctamente organizada. Los embriones de esta última clase pueden presentar otros defectos debidos al morfolino como apoptosis en la cabeza, edemas de corazón, etc. (Figura 78C). Como se ve en las gráficas de la figura 78B y C, la inyección de ARNm en la YSL produce un rescate parcial del fenotipo *knock-down*. Esto indica que z-chimaerin regula epiboli y que es necesaria en la YSL para la correcta distribución de las células a lo largo del eje ántero-posterior durante la gastrulación.

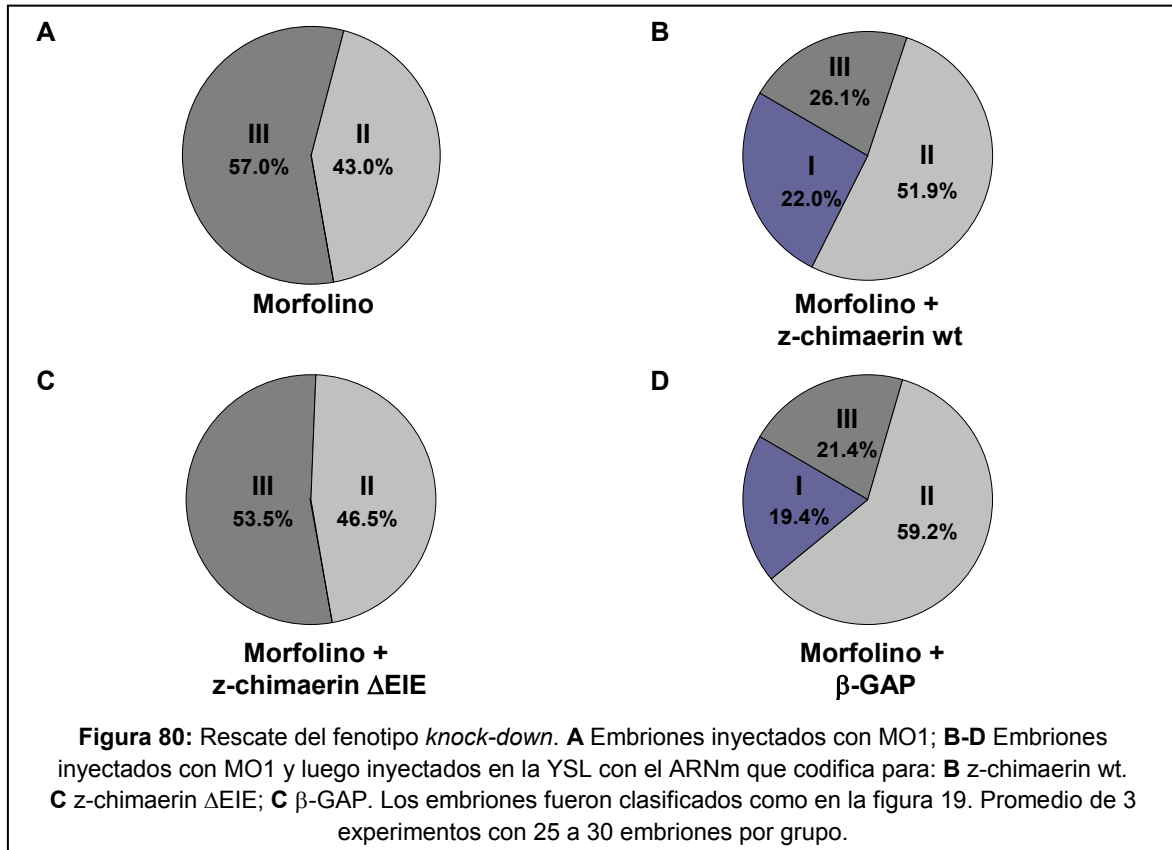


Para comprobar si el efecto de z-chimaerin en el fenotipo está mediado por Rac, se estudió si la actividad de GAP de z-chimaerin era necesaria para el rescate del fenotipo. Para ello se construyó una mutante de z-chimaerin con el dominio de GAP inactivo (Δ EIE) [46]. Como se muestra en la figura 79A se eliminaron por PCR tres aminoácidos, Glu-Ile-Glu, del sitio activo del dominio de GAP de z-chimaerin. La figura 79B muestra que la mutante Δ EIE es incapaz de reducir los niveles de Rac-GTP en células COS1.

La mutante z-chimaerin- Δ EIE y el dominio de GAP de β 2-chimaerin (β -GAP) se clonaron en el vector pCS2-F y se utilizaron para sintetizar ARNm *in vitro*, tal como se hizo previamente con z-chimaerin wt (Métodos).



La sobreexpresión de *z-chimaerin*- Δ EIE en la YSL no tuvo efecto sobre el fenotipo en los embriones *knock-down* (Figura 80C). Por otro lado, la sobreexpresión de un dominio de GAP heterólogo, el β -GAP (dominio de GAP de β -chimaerin), fue suficiente para alcanzar niveles de rescate similares a los alcanzados con *z-chimaerin* wt (Figura 80D). Esto indica que la actividad de GAP es necesaria y suficiente para el rescate parcial del fenotipo.

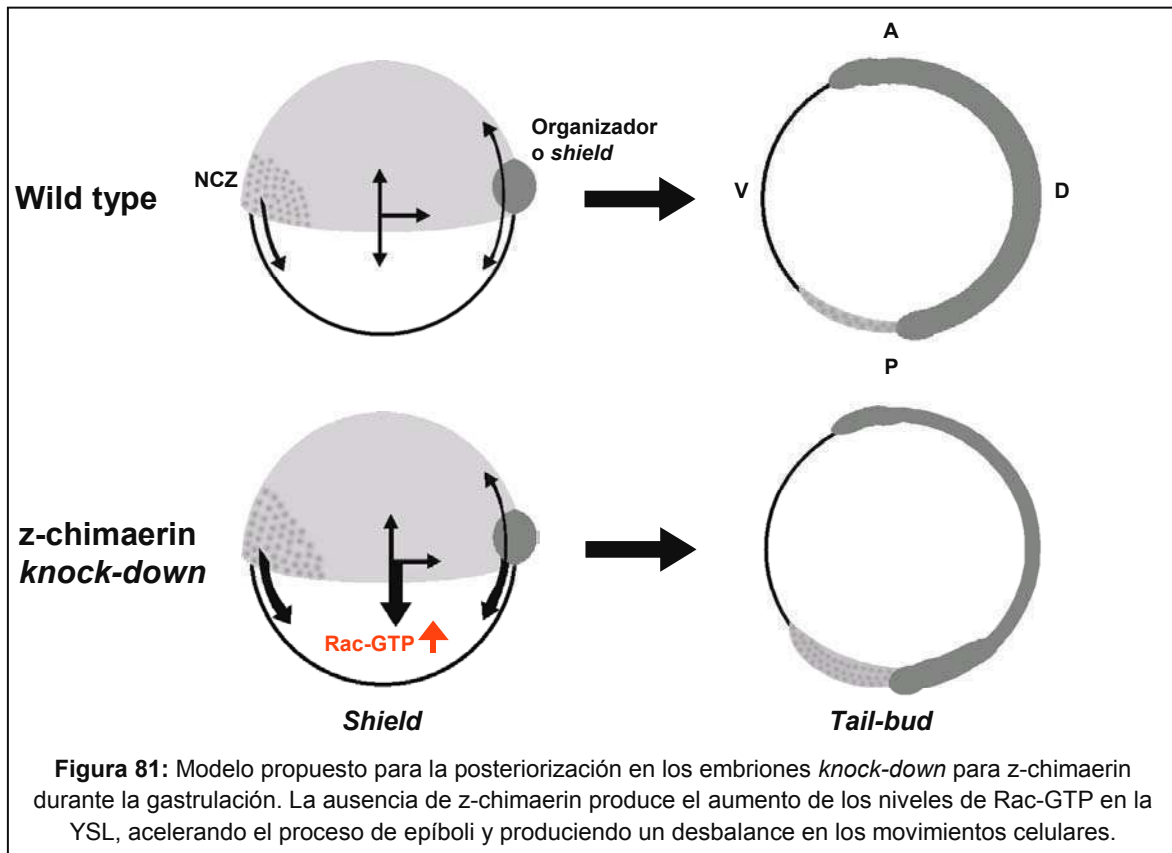


VII.3 Conclusiones

Hemos logrado silenciar la expresión de z-chimaerin en embriones de zebrafish microinyectando oligonucleótidos morfolínicos complementarios a la región 5' no codificante del ARNm. El silenciamiento de la expresión de z-chimaerin en embriones provoca un fuerte fenotipo. Estos embriones no sobreviven mas allá de 4 dpf y muestran diversas anomalías como ausencia de la extensión del saco vitelino, notocorda desviada, somitas irregulares y cola curvada, entre otras. Todos estos defectos, así como otros más generales y tardíos (como por ejemplo el desarrollo de edemas de corazón, fallas para inflar la vejiga natatoria y problemas motores) se deben a defectos tempranos. Esta asunción se basa en la gran cantidad de mutantes caracterizadas y la comparación de sus fenotipos.

Clonamos el gen que codifica para la proteína Rac1 de zebrafish. Esta proteína es 99% idéntica a la humana y a la de *Xenopus*. Al igual que z-chimaerin, z-Rac1 se expresa de forma materna y zigótica a lo largo del desarrollo del pez cebra. La disminución en los niveles de z-chimaerin mediante el uso de morfolinos, causa un aumento en los niveles de Rac-GTP a las 6 hpf (50% de epíboli). Este efecto se revierte cuando se sobrexprea z-chimaerin mediante la inyección de ARN mensajero. Esto demuestra la importancia de las quimerinas en la regulación de la actividad Rac y es la primera vez que se demuestra en un organismo vivo.

Un análisis más detallado de los embriones *knock-down* muestra que en el estadio de 8 somitas el eje de éstos es más angosto que en los controles. A las 24 hpf se pueden ver defectos en la formación de la YE y la notocorda. Estos defectos se deben a una posteriorización de los embriones debida a una descoordinación de los movimientos celulares durante la gastrulación y no a cambios *a priori* en los destinos celulares. Este desbalance de los movimientos celulares es producto de que el proceso de epíboli ocurre más rápido de lo normal. De esta forma las células que no alcanzan al eje dorsal se acumulan en la zona ventral, ocasionando la malformación de la extensión del saco vitelino y de la notocorda posterior. En la figura 81 se ilustra el modelo propuesto para la posteriorización en embriones *knock-down*.



Para rescatar el fenotipo en los embriones *knock-down* se reintrodujo z-chimaerin mediante la inyección del ARN mensajero en el estadio de una célula. La sobreexpresión de z-chimaerin más de 100 veces por encima de los niveles normales no ocasiona ningún defecto aparente durante el desarrollo. Embriones wt o inyectados con MOdes a los que se les inyectó ARNm en la YSL se desarrollan normalmente hasta por lo menos 7 dpf (no se han observado a los embriones más allá de este tiempo). Estos datos corroboran el modelo de auto-inhibición estructural de las quimerinas propuesto en el capítulo segundo, indicando que la mayor parte de z-chimaerin se encuentra en forma inactiva en el citoplasma. Esta sobreexpresión no ha sido suficiente para rescatar el fenotipo de los embriones inyectados con MO. Para explicar esto se propone que la actividad de z-chimaerin sería necesaria en el saco vitelino. Al inyectar el ARNm en el blastodermo, solo una pequeña fracción de éste y su producto pasarían a la capa sincitial del saco vitelino donde es necesaria su actividad. Esto no es suficiente para rescatar el fenotipo ya que al activarse por DAG y fosfolípidos de membrana se aumentaría su tasa de degradación. Para poner a prueba esta hipótesis se

sobreexpresó z-chimaerin directamente en la YSL. La inyección del ARNm de z-chimaerin en la YSL en embriones *knock-down* en estadio *high* produjo un rescate parcial del fenotipo, lo que corrobora nuestra hipótesis. Estos resultados sugieren además que en la YSL la producción de DAG es importante para la regulación de z-chimaerin. La sobreexpresión de la mutante z-chimaerin- Δ EIE no fue suficiente para rescatar el fenotipo, indicando que el rescate es dependiente de la actividad de GAP de z-chimaerin. La sobreexpresión de un dominio de GAP heterólogo como es el dominio de GAP de β 2-chimaerin (β -GAP), fue suficiente para alcanzar niveles de rescate similares a los alcanzados con z-chimaerin wt. Esto indica que la regulación de la señalización a través de Rac por z-chimaerin en la YSL es fundamental para regular la correcta progresión de epíboli.

Estos resultados muestran también la importancia de la coordinación de los distintos movimientos celulares a lo largo del proceso de gastrulación. Si bien se han descrito distintos mutantes donde el proceso de epíboli está afectado, todos estos mutantes muestran una menor velocidad de progresión y en muchos casos no llegan a completarlo. Al no completar epíboli, no se cierra el poro, dando como resultado embriones que mueren antes de desarrollar somitas o que presentan severos defectos de desarrollo como la espina bífida. Los embriones *knock-down* para z-chimaerin, en cambio, presentan un fenotipo único donde la posteriorización de los embriones es producto de la aceleración del proceso de epíboli.

VIII- Conclusiones Finales

VIII.1 La familia de las β -chimaerins

Las quimerinas son una familia de Rac-GAPs reguladas por el segundo mensajero DAG. En mamíferos están codificadas por dos genes, α y β . Como hemos mostrado en el capítulo primero, el gen β codifica para varias isoformas con distintos dominios N-terminales. Si bien no podemos descartar que algunas isoformas se originen por *splicing* alternativo, las isoformas $\beta 1$, $\beta 2$ (la isoforma reportada por Yuan et al. [52]) y la que hemos denominado $\beta 3$ se originan por orígenes de la transcripción alternativos. Esto implica que cada una de estas tres isoformas tiene un promotor específico. A su vez, suponemos que la isoforma clonada de tejido nervioso por Leung *et al.* [174] y de forma independiente por nuestro laboratorio [38] se originaría por un fenómeno de *trans-splicing*.

Este tipo de regulación llama particularmente la atención por dos motivos:

- El primero es que como se vio en la estructura cristalográfica y en el modelo de activación propuesto, las regiones N-terminal son importantes en la regulación estérica de la proteína. Diferentes motivos N-terminales podrían conferir distintas sensibilidades al DAG. Un ejemplo de esto es $\beta 1$ -chimaerin que mostró no estar autoinhibida al carecer de gran parte de la porción N-terminal. Esta isoforma podría representar una forma constitutivamente activada. Para las isoformas de $\beta 2$ -chimaerin descritas en el capítulo primero podemos imaginar que las distintas variantes en los extremos N-terminales responden a distintos grados de autoinhibición. La isoforma encontrada en páncreas, por ejemplo, no tendría el dominio de GAP autoinhibido al carecer la α hélice N-terminal que contienen las prolinas inhibitorias. Para $\beta 3$ -chimaerin en cambio, la presencia de un dominio extra podría modificar su actividad y localización de varias formas distintas.
- El segundo motivo se refiere a la regulación del ARN mensajero, ya que distintos extremos 5' no codificantes podrían conferir distinta estabilidad al mensajero, distinto grado de traducción o distinta localización dentro de la célula. Esta regulación del ARNm es sumamente importante en neuronas, donde los mensajeros son transportados a lo largo de los axones y dendritas [199]. Dado que Rac está involucrada en la regulación del crecimiento y la navegación de los axones, una posible explicación para el origen de la isoforma de cerebelo descrita por Leung *et al.* [174] sería que en estas neuronas, el

mensajero de β 2-chimaerin sea sometido a una modificación post-transcripcional del tipo *trans-splicing* para ser transportado a través de los axones y/o dendritas. Se ha reportado que Rac y su activador Tiam-1 se localizan en el cono de crecimiento axonal en neuronas y que su actividad promueve la formación y extensión de prolongaciones axones [200]. Cuando un axón se extiende, su navegación hasta encontrar diana específica está regulada por diferentes señales externas, que llevan finalmente a la activación de Rac, con la consecuente remodelación del citoesqueleto de actina para avanzar en la dirección apropiada. Para que esto ocurra con precisión es necesario el apagado de la señal de Rac, indicando que la función de β 2-chimaerin en los conos de crecimiento podría ser fundamental para esta regulación.

VIII.2 β 2-chimaerin como modelo de proteínas activada por DAG

De la estructura en tres dimensiones de β 2-chimaerin se pudo ver que el dominio C1 se encontraba “enterrado” entre los demás dominios. Esto explica las observaciones previas de nuestro laboratorio con relación a su baja sensibilidad al tratamiento con ésteres de forbol. El modelo propuesto para la activación por lípidos fue corroborado con la construcción de las SUPER-chimaerins. Estas mutantes de aminoácidos individuales involucrados en interacciones intramoleculares, mostraron ser 100 veces más sensibles a la translocación por PMA. Esto confirma que al desestabilizar la estructura terciaria el dominio C1 queda expuesto y permite la activación alostérica de la proteína a través de la interacción con los fosfolípidos de membrana. Las SUPER-chimaerin también mostraron ser GAPs más potentes que la proteína salvaje, lo que confirma que el dominio GAP se encuentra estéricamente inhibido por la α hélice N-terminal.

El modelo de activación de β 2-chimaerin tiene importancia para entender el funcionamiento de otras proteínas con dominios C1. Si bien las estructuras de los dominios C1 y C2 de las PKCs han sido determinadas, no se ha podido determinar la estructura de una PKC intacta. Al igual que β 2-chimaerin, las PKCs son activadas *in vivo* e *in vitro* por ésteres de forbol y DAG en presencia de fosfolípidos. Las PKCs tiene una región autoinhibitoria, el pseudo-sustrato, que se postula que es removida del sitio catalítico tras la interacción con

ésteres de forbol (o DAG) y fosfolípidos en la membrana. Algo análogo hemos encontrado en β 2-chimaerin, donde la región α hélice N-terminal que inhibe la actividad de GAP bloqueando el sitio de unión a Rac es removida luego de la interacción con los lípidos de membrana.

Las PKCs poseen dos dominios C1 y hay evidencias que indican que tienen funciones distintas [201]. En el caso de PKC δ , por ejemplo, uno de estos dominios se encontraría expuesto y sería responsable de la translocación de la proteína a membrana. El otro dominio estaría enterrado en la estructura terciaria por lo que se encontraría menos accesible y sería responsable de la activación alostérica de la proteína al insertarse en la membrana. β 2-chimaerin es un ejemplo de proteína con un dominio C1 enterrado responsable de la activación. En β 2-chimaerin el dominio C1 es un “translocador” ineficiente y se puede postular que cumple una función activadora y no localizadora. La presencia de un dominio SH2 hace pensar que éste podría cumplir la función de “translocador” o localizador.

VIII.3 β 2-chimaerin y su interacción con proteínas fosforiladas en tirosina

En el tercer capítulo se mostró que el dominio SH2 de β 2-chimaerin es capaz de unir proteínas fosforiladas en tirosinas. Si bien no se ha podido aislar a estas proteínas por la baja solubilidad del dominio SH2 fusionado a GST, hemos visto que ciertas fosfoproteínas interactúan de forma específica con este dominio. Sin embargo hemos podido aislar proteínas fosforiladas en tirosina que interactúan con β 2-chimaerin completa. Inesperadamente estas proteínas contenían dominios de unión al ARN. Este dominio mostró ser suficiente y necesario para la unión *in vitro*. Una de estas proteínas (G3BP, también conocida como Rasputin) fue descrita como capaz de unirse a RasGAP y actuaría como un nexo entre la señalización de Ras y Rho en *Drosophila* [190]. El hecho de que G3BP se una a dos GAPs, Ras-GAP y a β 2-chimaerin, puede indicar que se trata de una proteína adaptadora involucrada en el apagado de la señalización a través de las pequeñas proteínas que unen GTP. Estas proteínas pueden actuar reclutando β 2-chimaerin a distintas regiones dentro de la célula o bien β 2-chimaerin podría funcionar como un ancla de membrana

cuando está activada, posicionando a estas proteínas en la membrana plasmática. Obviamente se necesitan estudios adicionales para confirmar la relevancia funcional de estas interacciones, estudios que seguramente brindarán importante información sobre la regulación de las quimerinas a través de mecanismos de interacción proteína-proteína. En el modelo de la figura 82 se representaron estas proteínas con un signo de interrogación.

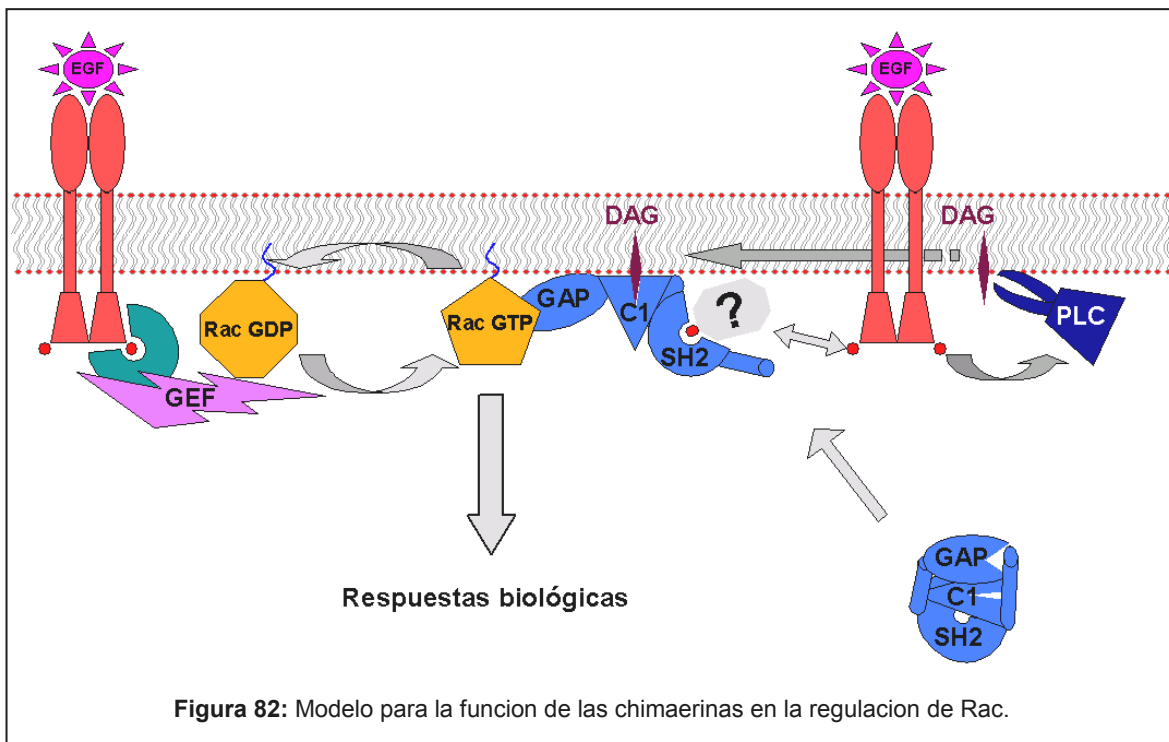
VIII.4 Las SUPER-chimaerins y el nexo entre Rac y el segundo mensajero DAG

Durante mucho tiempo se creyó que las PKCs eran las únicas proteínas activadas por el DAG y los ésteres de forbol. El descubrimiento de los receptores para DAG sin actividad quinasa, como es el caso de las quimerinas, rompió con este dogma. En nuestro laboratorio se mostró que en células COS-1 tratadas con PMA en presencia de inhibidores de PKC los niveles de Rac-GTP disminuían considerablemente [46]. Este fenómeno es probablemente debido a la presencia de quimerinas endógenas. Como se dijo en la introducción, Rac juega un papel muy importante en la transformación maligna, regulando la expresión de genes, la migración y proliferación celular, el ciclo celular y la remodelación del citoesqueleto de actina. Recientemente nuestro laboratorio ha reportado que la expresión de β 2-chimaerin se encuentra considerablemente disminuida en células de cáncer de mama y en tumores de mama. En estas células la sobreexpresión de β 2-chimaerin, así como la expresión de pequeñas dosis de SUPER-chimaerins, reduce la actividad de Rac e inhibe la proliferación [202]. Esto indicaría que las quimerinas actúan como supresores tumorales en el cáncer de mama.

Analizando la interacción entre β 2-chimaerin y Rac1 por FRET, pudimos ver que estas proteínas se asocian en la membrana plasmática tras el tratamiento con PMA en presencia de inhibidores de PKCs. Este resultado afirma lo dicho en el párrafo anterior, y demuestra una vez más el papel que β 2-chimaerin juega en la regulación de Rac. Al utilizar las SUPER-chimaerins en los ensayos de FRET, observamos que éstas son mucho más sensibles al PMA. Cuando en vez de tratar con PMA estimulamos un receptor de membrana como el receptor de EGF, se vio que β 2-chimaerin es translocada a la membrana donde interactúa con Rac. Esta interacción es transitoria y depende del estado de activación de Rac,

dado que la interacción con la mutante GAP-inactiva ΔEIE se prolonga por más tiempo. Las SUPER-chimaerin mostraron ser más sensibles a la translocación mediada por la activación del receptor EGF como se mostró en la figura 31. Esta translocación es dependiente de la producción de DAG por PLC γ , dado que no ocurre si se inhibe farmacológicamente esta enzima o si se apaga su expresión con RNA de interferencia [178].

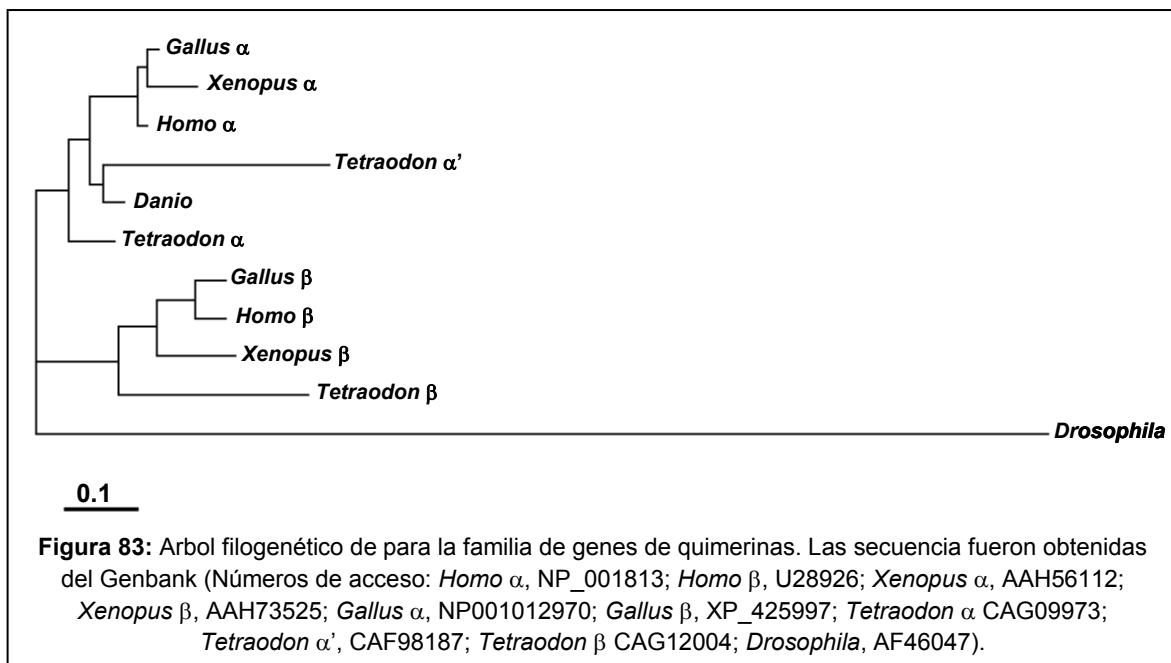
Esto deja en claro que las quimerinas son un blanco importante del segundo mensajero DAG y los ésteres de forbol y que cumplen una función fundamental en la regulación de la señalización a través de Rac (Figura 82).



VIII.5 Evolución de las quimerinas en los vertebrados

En la última parte de esta tesis doctoral se utilizó un modelo animal para el estudio de la función de las quimerinas. Según las secuencias reportadas en las bases de datos de secuencias de ARNms, ESTs y ADN geonómico (el genoma del zebrafish no ha sido ensamblado del todo, pero se cree tener un 99% secuenciado), el pez cebra posee un solo gen que codifica para quimerinas. Esto es particularmente interesante dado que este gen

parece haberse duplicado en el ancestro común a los vertebrados, donde se hipotetiza que hubo una duplicación genómica. En invertebrados como *Drosophila* y *Caenorhabditis*, encontramos un gen homólogo a las quimerinas de mamíferos. Entre los vertebrados los mamíferos, las aves, y los anfibios poseen dos genes que codifican para quimerinas. Los peces de género *Tetraodon* poseen tres copias de este gen, una copia homóloga al gen β y dos homólogas al gen α . Esto indica que la tercer copia posiblemente se haya originado por una subduplicación del gen α (Figura 83). El hecho de que en peces del género *Danio* encontremos sólo una copia (perteneciente al grupo de las α) indicaría que han perdido durante su evolución la segunda copia (β). Esta pérdida indicaría también una simplificación en la función de las quimerinas, donde la copia restante suple la función de la perdida. Esto hace suponer que z-chimaerin llevaría a cabo la función básica y ancestral de las quimerinas. El clonado de z-chimaerin reveló que posee una gran identidad de secuencia con α 2-chimaerin, y su caracterización bioquímica confirmó que se comporta de forma similar a la isoformas de mamíferos. Esto hace del pez cebrá un modelo único para el estudio *in vivo* de la función de las quimerinas.



VIII.6 La función de las quimerinas en el desarrollo del zebrafish

z-chimaerin se expresa de forma materna y su expresión se restringe al tejido nervioso tras 24 hpf. Si se apaga la expresión de z-chimaerin durante el desarrollo embrionario utilizando morfolidos antisentido se observa un aumento en los niveles de Rac-GTP y un fuerte fenotipo. Este aumento de los niveles de Rac-GTP en embriones al 50% de epíboli (justo antes de comenzar la gastrulación) es la primera evidencia en un organismo vivo de la importancia de las quimerinas en la regulación de la actividad de Rac.

Del análisis del fenotipo en embriones *knock-down* se vio que éstos estaban posteriorizados, y que esto era debido a que el movimiento de epíboli ocurría más deprisa, ocasionando un desbalance en los movimientos de las células durante la gastrulación. Mediante experimentos de rescate del fenotipo inyectando RNAm para re-expresar z-chimaerin en embriones *knock-down* se vio que la actividad de z-chimaerin era requerida en la YSL. Lo poco que se conoce acerca de la regulación del movimiento de epíboli por la YSL indica que tanto los microtúbulos como un anillo de actina contráctil serían los responsables de proveer la fuerza de tracción suficiente para que este proceso ocurra [194]. Dado que Rac es un importante remodelador del citosqueleto, es lógico pensar que la actividad de z-chimaerin es necesaria en la YSL para regular a Rac [122]. Para comprobar esto se mutó el dominio de GAP de z-chimaerin. La mutante GAP inactiva Δ EIE es incapaz de rescatar el fenotipo lo cual sugiere que la función de z-chimaerin en la YSL requiere de la actividad de Rac-GAP. La sobreexpresión de un dominio de Rac-GAP en la YSL fue suficiente para revertir parcialmente el fenotipo, indicando que la mayor actividad de Rac en la YSL era responsable del fenotipo observado.

La sobreexpresión de z-chimaerin en el blastodermo en embriones en estadio de una célula no produce ninguna consecuencia fenotípica obvia. Esto puede ser explicado desde el punto de vista del modelo de activación de las quimerinas. z-chimaerin une ésteres de forbol *in vitro* con la misma afinidad que las PKCs, pero en células responde a PMA a concentraciones similares que β 2-chimaerin. Además, z-chimaerin conserva todos los aminoácidos involucrados en la autoinhibición y las interacciones intramoleculares. Por lo tanto, cuando se sobreexpresa z-chimaerin en el blastodermo, los excesos de ésta quedan inactivos, siendo el limitante la producción de DAG y la activación alostérica por éste.

Los embriones *knock-down* para *z-chimaerin* presentan un fenotipo sumamente interesante para el estudio de los movimientos durante la gastrulación. En la literatura se han reportado varios mutantes que presentan defectos en el movimiento de epíboli, pero en todos ellos el movimiento de epíboli está retrasado o interrumpido. Al interrumpirse el movimiento de epíboli, el embrión no se extiende correctamente. En el caso del *knock-down* para *z-chimaerin*, epíboli ocurre más deprisa llevando a que el embrión se extienda más rápidamente y que la migración de células laterales para convergir en el eje dorsal parezca retrasada. Esto nos permite ver que existe una coordinación espacio-temporal de los distintos movimientos durante la gastrulación y que de esto depende el destino de las células en el embrión.

IX- Bibliografía

1. Kazanietz, M.G., et al., *Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(2): p. 298-307.
2. Coussens, L., et al., *Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways*. Science, 1986. **233**(4766): p. 859-66.
3. Kazanietz, M.G., et al., *Zinc finger domains and phorbol ester pharmacophore. Analysis of binding to mutated form of protein kinase C zeta and the vav and c-raf proto-oncogene products*. J Biol Chem, 1994. **269**(15): p. 11590-4.
4. Kazanietz, M.G., *Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters*. Mol Carcinog, 2000. **28**(1): p. 5-11.
5. Kazanietz, M.G., et al., *Residues in the second cysteine-rich region of protein kinase C delta relevant to phorbol ester binding as revealed by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 21852-9.
6. Zhang, G., et al., *Crystal structure of the cys2 activator-binding domain of protein kinase C delta in complex with phorbol ester*. Cell, 1995. **81**(6): p. 917-24.
7. Wang, Q.J., et al., *Role of hydrophobic residues in the C1b domain of protein kinase C delta on ligand and phospholipid interactions*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19580-7.
8. Orr, J.W., L.M. Keranen, and A.C. Newton, *Reversible exposure of the pseudosubstrate domain of protein kinase C by phosphatidylserine and diacylglycerol*. J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 15263-6.
9. Dutil, E.M. and A.C. Newton, *Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10697-701.
10. Mott, H.R., et al., *The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8312-7.
11. Newton, A.C., *Protein kinase C. Seeing two domains*. Curr Biol, 1995. **5**(9): p. 973-6.
12. Newton, A.C., *Protein kinase C: structure, function, and regulation*. J Biol Chem, 1995. **270**(48): p. 28495-8.
13. Inoue, M., et al., *Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain*. J Biol Chem, 1977. **252**(21): p. 7610-6.
14. Hurley, J.H., et al., *Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains*. Protein Sci, 1997. **6**(2): p. 477-80.
15. Ron, D. and M.G. Kazanietz, *New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors*. Faseb J, 1999. **13**(13): p. 1658-76.
16. Mosior, M. and A.C. Newton, *Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters. Reversibility and nature of membrane association*. J Biol Chem, 1995. **270**(43): p. 25526-33.
17. Nishizuka, Y., *Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses*. Faseb J, 1995. **9**(7): p. 484-96.
18. Maruyama, I.N. and S. Brenner, *A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the unc-13 gene of Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(13): p. 5729-33.
19. Kazanietz, M.G., et al., *Characterization of the cysteine-rich region of the Caenorhabditis elegans protein Unc-13 as a high affinity phorbol ester receptor. Analysis of ligand-binding interactions, lipid cofactor requirements, and inhibitor sensitivity*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10777-83.

20. Betz, A., et al., *Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release*. *Neuron*, 1998. **21**(1): p. 123-36.
21. Betz, A., et al., *Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(4): p. 2520-6.
22. Betz, A., et al., *Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming*. *Neuron*, 2001. **30**(1): p. 183-96.
23. Sakaguchi, G., et al., *A novel brain-specific isoform of beta spectrin: isolation and its interaction with Munc13*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **248**(3): p. 846-51.
24. Duncan, R.R., et al., *Transient, phorbol ester-induced DOC2-Munc13 interactions in vivo*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 27347-50.
25. Ebinu, J.O., et al., *RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs*. *Science*, 1998. **280**(5366): p. 1082-6.
26. Kawasaki, H., et al., *A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(22): p. 13278-83.
27. Tognon, C.E., et al., *Regulation of RasGRP via a phorbol ester-responsive C1 domain*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(12): p. 6995-7008.
28. Yamashita, S., et al., *CalDAG-GEFIII activation of Ras, R-ras, and Rap1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(33): p. 25488-93.
29. Lorenzo, P.S., et al., *The guanine nucleotide exchange factor RasGRP is a high -affinity target for diacylglycerol and phorbol esters*. *Mol Pharmacol*, 2000. **57**(5): p. 840-6.
30. Cai, H., et al., *Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isotypes in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(2): p. 732-41.
31. El-Shemerly, M.Y., et al., *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate activates the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway upstream of SOS involving serine phosphorylation of Shc in NIH3T3 cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(49): p. 30599-602.
32. Marais, R., et al., *Requirement of Ras-GTP-Raf complexes for activation of Raf-1 by protein kinase C*. *Science*, 1998. **280**(5360): p. 109-12.
33. Schonwasser, D.C., et al., *Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(2): p. 790-8.
34. Lorenzo, P.S., et al., *Phorbol esters modulate the Ras exchange factor RasGRP3*. *Cancer Res*, 2001. **61**(3): p. 943-9.
35. Clyde-Smith, J., et al., *Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(41): p. 32260-7.
36. Hall, C., et al., *Novel human brain cDNA encoding a 34,000 Mr protein n-chimaerin, related to both the regulatory domain of protein kinase C and BCR, the product of the breakpoint cluster region gene*. *J Mol Biol*, 1990. **211**(1): p. 11-6.
37. Hall, C., et al., *Alpha 2-chimerin, an SH2-containing GTPase-activating protein for the ras-related protein p21rac derived by alternate splicing of the human n-chimerin gene, is selectively expressed in brain regions and testes*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(8): p. 4986-98.
38. Caloca, M.J., et al., *Beta2-chimaerin is a high affinity receptor for the phorbol ester tumor promoters*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(42): p. 26488-96.
39. Caloca, M.J., et al., *beta2-chimaerin is a novel target for diacylglycerol: binding properties and changes in subcellular localization mediated by ligand binding to its C1 domain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(21): p. 11854-9.

40. Caloca, M.J., et al., *Phorbol esters and related analogs regulate the subcellular localization of beta 2-chimaerin, a non-protein kinase C phorbol ester receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(21): p. 18303-12.
41. Kazanietz, M.G., *Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection*. Mol Pharmacol, 2002. **61**(4): p. 759-67.
42. Oancea, E., et al., *Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells*. J Cell Biol, 1998. **140**(3): p. 485-98.
43. Wang, H. and M.G. Kazanietz, *Chimaerins, novel non-protein kinase C phorbol ester receptors, associate with Tmp21-I (p23): evidence for a novel anchoring mechanism involving the chimaerin C1 domain*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4541-50.
44. Huijbregts, R.P., L. Topalof, and V.A. Bankaitis, *Lipid metabolism and regulation of membrane trafficking*. Traffic, 2000. **1**(3): p. 195-202.
45. Diekmann, D., et al., *Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac*. Nature, 1991. **351**(6325): p. 400-2.
46. Caloca, M.J., H. Wang, and M.G. Kazanietz, *Characterization of the Rac-GAP (Rac-GTPase-activating protein) activity of beta2-chimaerin, a 'non-protein kinase C' phorbol ester receptor*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 2): p. 313-21.
47. Menna, P.L., et al., *Inhibition of aggressiveness of metastatic mouse mammary carcinoma cells by the beta2-chimaerin GAP domain*. Cancer Res, 2003. **63**(9): p. 2284-91.
48. Coso, O.A., et al., *The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1137-46.
49. Kjoller, L. and A. Hall, *Signaling to Rho GTPases*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 166-79.
50. Herrera, R. and B.D. Shivers, *Expression of alpha 1-chimaerin (rac-1 GAP) alters the cytoskeletal and adhesive properties of fibroblasts*. J Cell Biochem, 1994. **56**(4): p. 582-91.
51. Cox, D., et al., *Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes*. J Exp Med, 1997. **186**(9): p. 1487-94.
52. Yuan, S., et al., *Identification and characterization of human beta 2-chimaerin: association with malignant transformation in astrocytoma*. Cancer Res, 1995. **55**(15): p. 3456-61.
53. Songyang, Z., et al., *SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences*. Cell, 1993. **72**(5): p. 767-78.
54. Hall, C., et al., *alpha2-chimaerin, a Cdc42/Rac1 regulator, is selectively expressed in the rat embryonic nervous system and is involved in neuritogenesis in NIE-115 neuroblastoma cells*. J Neurosci, 2001. **21**(14): p. 5191-202.
55. Hall, A., *The cellular functions of small GTP-binding proteins*. Science, 1990. **249**(4969): p. 635-40.
56. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions*. Nature, 1990. **348**(6297): p. 125-32.
57. Takai, Y., et al., *Small GTP-binding proteins*. Int Rev Cytol, 1992. **133**: p. 187-230.
58. Brown, R., et al., *Mechanism of activation of an N-ras gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080*. Embo J, 1984. **3**(6): p. 1321-6.
59. Ridley, A.J., et al., *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*. Cell, 1992. **70**(3): p. 401-10.

60. Geyer, M., et al., *Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling*. Nat Struct Biol, 1997. **4**(9): p. 694-9.
61. Casey, P.J. and M.C. Seabra, *Protein prenyltransferases*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5289-92.
62. Glomset, J.A. and C.C. Farnsworth, *Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes*. Annu Rev Cell Biol, 1994. **10**: p. 181-205.
63. Magee, A.I., et al., *Lipid modifications and function of the ras superfamily of proteins*. Biochem Soc Trans, 1992. **20**(2): p. 497-9.
64. Lutcke, A., et al., *Rab17, a novel small GTPase, is specific for epithelial cells and is induced during cell polarization*. J Cell Biol, 1993. **121**(3): p. 553-64.
65. Fischer von Mollard, G., et al., *rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(5): p. 1988-92.
66. Mizoguchi, A., et al., *Localization and subcellular distribution of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, in rat brain*. J Biol Chem, 1990. **265**(20): p. 11872-9.
67. Martinez, O. and B. Goud, *Rab proteins*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1404**(1-2): p. 101-12.
68. Sano, K., et al., *Tissue-specific expression of a novel GTP-binding protein (smg p25A) mRNA and its increase by nerve growth factor and cyclic AMP in rat pheochromocytoma PC-12 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **158**(2): p. 377-85.
69. Lang, P., et al., *Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes*. Embo J, 1996. **15**(3): p. 510-9.
70. Machesky, L.M. and A. Hall, *Rho: a connection between membrane receptor signalling and the cytoskeleton*. Trends Cell Biol, 1996. **6**(8): p. 304-10.
71. Just, I., et al., *The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins*. J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 13932-6.
72. Flatau, G., et al., *Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine*. Nature, 1997. **387**(6634): p. 729-33.
73. Doye, A., et al., *CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion*. Cell, 2002. **111**(4): p. 553-64.
74. Self, A.J. and A. Hall, *Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates*. Methods Enzymol, 1995. **256**: p. 67-76.
75. Ridley, A.J., *Rho: theme and variations*. Curr Biol, 1996. **6**(10): p. 1256-64.
76. Johnson, D.I. and J.R. Pringle, *Molecular characterization of CDC42, a Saccharomyces cerevisiae gene involved in the development of cell polarity*. J Cell Biol, 1990. **111**(1): p. 143-52.
77. Yamochi, W., et al., *Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 1994. **125**(5): p. 1077-93.
78. Begum, R., E.K.M.S. Nur, and M.A. Zaman, *The role of Rho GTPases in the regulation of the rearrangement of actin cytoskeleton and cell movement*. Exp Mol Med, 2004. **36**(4): p. 358-66.
79. Minden, A., et al., *Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1147-57.

80. Hill, C.S., J. Wynne, and R. Treisman, *The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF*. Cell, 1995. **81**(7): p. 1159-70.
81. Westwick, J.K., et al., *Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1324-35.
82. Perona, R., et al., *Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins*. Genes Dev, 1997. **11**(4): p. 463-75.
83. Sulciner, D.J., et al., *rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(12): p. 7115-21.
84. Mackay, D.J. and A. Hall, *Rho GTPases*. J Biol Chem, 1998. **273**(33): p. 20685-8.
85. Olson, M.F., A. Ashworth, and A. Hall, *An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1270-2.
86. Eva, A. and S.A. Aaronson, *Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma*. Nature, 1985. **316**(6025): p. 273-5.
87. Hart, M.J., et al., *Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product*. J Biol Chem, 1994. **269**(1): p. 62-5.
88. Zheng, Y., et al., *The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic dbl through specific intracellular targeting*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19017-20.
89. Zheng, J., et al., *The solution structure of the pleckstrin homology domain of human SOS1. A possible structural role for the sequential association of diffuse B cell lymphoma and pleckstrin homology domains*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30340-4.
90. Chen, R.H., S. Corbalan-Garcia, and D. Bar-Sagi, *The role of the PH domain in the signal-dependent membrane targeting of Sos*. Embo J, 1997. **16**(6): p. 1351-9.
91. Van Aelst, L. and C. D'Souza-Schorey, *Rho GTPases and signaling networks*. Genes Dev, 1997. **11**(18): p. 2295-322.
92. Habets, G.G., et al., *Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin*. Oncogene, 1995. **10**(7): p. 1371-6.
93. Zhou, K., et al., *Guanine nucleotide exchange factors regulate specificity of downstream signaling from Rac and Cdc42*. J Biol Chem, 1998. **273**(27): p. 16782-6.
94. Cerione, R.A. and Y. Zheng, *The Dbl family of oncogenes*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(2): p. 216-22.
95. Meller, N., et al., *Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 639-47.
96. Cote, J.F. and K. Vuori, *Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 24): p. 4901-13.
97. Brugnera, E., et al., *Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 574-82.
98. Michiels, F., et al., *Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation*. J Cell Biol, 1997. **137**(2): p. 387-98.
99. Feig, L.A., *Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(2): p. 204-11.

100. Knaus, U.G., et al., *Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21512-8.
101. Lancaster, C.A., et al., *Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1137-42.
102. Takai, Y., et al., *Rho as a regulator of the cytoskeleton*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(6): p. 227-31.
103. Nishiyama, T., et al., *rac p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and rho p21 is involved in hepatocyte growth factor- and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(4): p. 2447-56.
104. Wu, S.K., et al., *Molecular role for the Rab binding platform of guanine nucleotide dissociation inhibitor in endoplasmic reticulum to Golgi transport*. J Biol Chem, 1998. **273**(41): p. 26931-8.
105. Hart, M.J., et al., *Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13*. Science, 1998. **280**(5372): p. 2112-4.
106. Kozasa, T., et al., *p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13*. Science, 1998. **280**(5372): p. 2109-11.
107. Fukuhara, S., H. Chikumi, and J.S. Gutkind, *RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho?* Oncogene, 2001. **20**(13): p. 1661-8.
108. Mertens, A.E., R.C. Roovers, and J.G. Collard, *Regulation of Tiam1-Rac signalling*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 11-6.
109. Brandt, D., et al., *Protein kinase C induces actin reorganization via a Src- and Rho-dependent pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20903-10.
110. Schmidt, S., et al., *Identification of the first Rho-GEF inhibitor, TRIPalpha, which targets the RhoA-specific GEF domain of Trio*. FEBS Lett, 2002. **523**(1-3): p. 35-42.
111. Scita, G., et al., *EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac*. Nature, 1999. **401**(6750): p. 290-3.
112. Nimnual, A.S., B.A. Yatsula, and D. Bar-Sagi, *Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos*. Science, 1998. **279**(5350): p. 560-3.
113. Innocenti, M., et al., *Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1*. J Cell Biol, 2003. **160**(1): p. 17-23.
114. Lambert, J.M., et al., *Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(8): p. 621-5.
115. DeMali, K.A., K. Wennerberg, and K. Burridge, *Integrin signaling to the actin cytoskeleton*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(5): p. 572-82.
116. Braga, V.M., *Cell-cell adhesion and signalling*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 546-56.
117. Thompson, P.W., A.M. Randi, and A.J. Ridley, *Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells*. J Immunol, 2002. **169**(2): p. 1007-13.
118. Noren, N.K., W.T. Arthur, and K. Burridge, *Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 13615-8.
119. Schmidt, A. and M.N. Hall, *Signaling to the actin cytoskeleton*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 305-38.
120. Martin, T.F., *Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 231-64.

121. Janmey, P.A., *Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly*. *Annu Rev Physiol*, 1994. **56**: p. 169-91.
122. Hall, A., *Rho GTPases and the actin cytoskeleton*. *Science*, 1998. **279**(5350): p. 509-14.
123. Jaffe, A.B. and A. Hall, *Cell biology. Smurfing at the leading edge*. *Science*, 2003. **302**(5651): p. 1690-1.
124. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. *Cell*, 1995. **81**(1): p. 53-62.
125. Khosravi-Far, R., et al., *Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins*. *Adv Cancer Res*, 1998. **72**: p. 57-107.
126. Kozma, R., et al., *The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(4): p. 1942-52.
127. Mackay, D.J., et al., *Rho- and rac-dependent assembly of focal adhesion complexes and actin filaments in permeabilized fibroblasts: an essential role for ezrin/radixin/moesin proteins*. *J Cell Biol*, 1997. **138**(4): p. 927-38.
128. Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka, *Focal adhesions, contractility, and signaling*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996. **12**: p. 463-518.
129. Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge, *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*. *J Cell Biol*, 1996. **133**(6): p. 1403-15.
130. Kimura, K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. *Science*, 1996. **273**(5272): p. 245-8.
131. Amano, M., et al., *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(34): p. 20246-9.
132. Watanabe, N., et al., *Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization*. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(3): p. 136-43.
133. Li, F. and H.N. Higgs, *The mouse Formin mDial is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition*. *Curr Biol*, 2003. **13**(15): p. 1335-40.
134. Eden, S., et al., *Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck*. *Nature*, 2002. **418**(6899): p. 790-3.
135. Sells, M.A., et al., *Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells*. *Curr Biol*, 1997. **7**(3): p. 202-10.
136. Manser, E., et al., *Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(3): p. 1129-43.
137. Sander, E.E., et al., *Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior*. *J Cell Biol*, 1999. **147**(5): p. 1009-22.
138. Blanchard, J.M., *Small GTPases, adhesion, cell cycle control and proliferation*. *Pathol Biol (Paris)*, 2000. **48**(3): p. 318-27.
139. Joyce, D., et al., *Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(36): p. 25245-9.
140. Lin, R., R.A. Cerione, and D. Manor, *Specific contributions of the small GTPases Rho, Rac, and Cdc42 to Dbl transformation*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(33): p. 23633-41.
141. Prendergast, G.C., et al., *Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras*. *Oncogene*, 1995. **10**(12): p. 2289-96.

142. Qiu, R.G., et al., *An essential role for Rac in Ras transformation*. Nature, 1995. **374**(6521): p. 457-9.
143. Evers, E.E., et al., *Rho family proteins in cell adhesion and cell migration*. Eur J Cancer, 2000. **36**(10): p. 1269-74.
144. Solnica-Krezel, L., *Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation*. Curr Biol, 2005. **15**(6): p. R213-28.
145. Habas, R., I.B. Dawid, and X. He, *Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation*. Genes Dev, 2003. **17**(2): p. 295-309.
146. Tahinci, E. and K. Symes, *Distinct functions of Rho and Rac are required for convergent extension during Xenopus gastrulation*. Dev Biol, 2003. **259**(2): p. 318-35.
147. Wunnenberg-Stapleton, K., et al., *Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early Xenopus development*. Development, 1999. **126**(23): p. 5339-51.
148. Wallingford, J.B. and R.M. Harland, *Xenopus Dishevelled signaling regulates both neural and mesodermal convergent extension: parallel forces elongating the body axis*. Development, 2001. **128**(13): p. 2581-92.
149. Bakkers, J., et al., *Has2 is required upstream of Rac1 to govern dorsal migration of lateral cells during zebrafish gastrulation*. Development, 2004. **131**(3): p. 525-37.
150. Marlow, F., et al., *Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements*. Curr Biol, 2002. **12**(11): p. 876-84.
151. Sugihara, K., et al., *Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation*. Oncogene, 1998. **17**(26): p. 3427-33.
152. Murphy, A.M. and D.J. Montell, *Cell type-specific roles for Cdc42, Rac, and RhoL in Drosophila oogenesis*. J Cell Biol, 1996. **133**(3): p. 617-30.
153. Hariharan, I.K., et al., *Characterization of rho GTPase family homologues in Drosophila melanogaster: overexpressing Rho1 in retinal cells causes a late developmental defect*. Embo J, 1995. **14**(2): p. 292-302.
154. Newsome, T.P., et al., *Trio combines with dock to regulate Pak activity during photoreceptor axon pathfinding in Drosophila*. Cell, 2000. **101**(3): p. 283-94.
155. Hakeda-Suzuki, S., et al., *Rac function and regulation during Drosophila development*. Nature, 2002. **416**(6879): p. 438-42.
156. Magie, C.R., et al., *Mutations in the Rho1 small GTPase disrupt morphogenesis and segmentation during early Drosophila development*. Development, 1999. **126**(23): p. 5353-64.
157. Nieto, M.A., *Molecular biology of axon guidance*. Neuron, 1996. **17**(6): p. 1039-48.
158. Letourneau, P.C., *The cytoskeleton in nerve growth cone motility and axonal pathfinding*. Perspect Dev Neurobiol, 1996. **4**(2-3): p. 111-23.
159. Luo, L., *Rho GTPases in neuronal morphogenesis*. Nat Rev Neurosci, 2000. **1**(3): p. 173-80.
160. Luo, L., et al., *Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines*. Nature, 1996. **379**(6568): p. 837-40.
161. Streisinger, G., et al., *Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish*. Genetics, 1986. **112**(2): p. 311-9.
162. Haffter, P. and C. Nusslein-Volhard, *Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish*. Int J Dev Biol, 1996. **40**(1): p. 221-7.

163. Haffter, P., et al., *The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio*. Development, 1996. **123**: p. 1-36.
164. Kimmel, C.B., et al., *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev Dyn, 1995. **203**(3): p. 253-310.
165. *The Zebrafish Book*. 3, 1995 ed, ed. I.o.N. Monte Westerfield, University of Oregon. 1993, Eugene, Or 97403-1254: University of Oregon Press.
166. Driever, W. and M.C. Fishman, *The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos*. J Clin Invest, 1996. **97**(8): p. 1788-94.
167. Amsterdam, A., et al., *Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos*. Gene, 1996. **173**(1 Spec No): p. 99-103.
168. Nasevicius, A. and S.C. Ekker, *Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish*. Nat Genet, 2000. **26**(2): p. 216-20.
169. Summerton, J. and D. Weller, *Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1997. **7**(3): p. 187-95.
170. Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. **7**(6): p. 1513-23.
171. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, 1990. **215**(3): p. 403-10.
172. Thompson, J.D., et al., *The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(24): p. 4876-82.
173. Guindon, S. and O. Gascuel, *A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood*. Syst Biol, 2003. **52**(5): p. 696-704.
174. Leung, T., et al., *Cerebellar beta 2-chimaerin, a GTPase-activating protein for p21 ras-related rac is specifically expressed in granule cells and has a unique N-terminal SH2 domain*. J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12888-92.
175. Adams, M.D., et al., *Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project*. Science, 1991. **252**(5013): p. 1651-6.
176. Sharp, P.A., *Trans splicing: variation on a familiar theme?* Cell, 1987. **50**(2): p. 147-8.
177. Canagarajah, B., et al., *Structural mechanism for lipid activation of the Rac-specific GAP, beta2-chimaerin*. Cell, 2004. **119**(3): p. 407-18.
178. Wang, H., et al., *Linking diacylglycerol signaling to the Rac GTPase: C1-domain-mediated membrane targeting of b2-chimaerin as a mechanism for Rac inactivation*. submitted for publication, 2005.
179. Ginisty, H., et al., *Structure and functions of nucleolin*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 6): p. 761-72.
180. Lapeyre, B., H. Bourbon, and F. Amalric, *Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(6): p. 1472-6.
181. Allain, F.H., et al., *Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target*. J Mol Biol, 2000. **303**(2): p. 227-41.
182. Lischwe, M.A., et al., *Nucleolar specific acidic phosphoprotein C23 is highly methylated*. J Biol Chem, 1982. **257**(24): p. 14600-2.
183. Xue, Z., et al., *The amino terminus of mammalian nucleolin specifically recognizes SV40 T-antigen type nuclear localization sequences*. Eur J Cell Biol, 1993. **62**(1): p. 13-21.

184. Gil, D., D. Gutierrez, and B. Alarcon, *Intracellular redistribution of nucleolin upon interaction with the CD3epsilon chain of the T cell receptor complex*. J Biol Chem, 2001. **276**(14): p. 11174-9.
185. Hovanessian, A.G., et al., *The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton*. Exp Cell Res, 2000. **261**(2): p. 312-28.
186. Tuteja, N., et al., *Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation*. Gene, 1995. **160**(2): p. 143-8.
187. Tuteja, R. and N. Tuteja, *Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1998. **33**(6): p. 407-36.
188. Parker, F., et al., *A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(6): p. 2561-9.
189. Kennedy, D., et al., *Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies*. J Cell Biochem, 2001. **84**(1): p. 173-87.
190. Irvine, K., et al., *Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(10): p. 1065-77.
191. Costa, M., et al., *Human DNA helicase VIII: a DNA and RNA helicase corresponding to the G3BP protein, an element of the ras transduction pathway*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(3): p. 817-21.
192. Hammerschmidt, M., et al., *dino and mercedes, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo*. Development, 1996. **123**: p. 95-102.
193. Kudoh, T., et al., *A gene expression screen in zebrafish embryogenesis*. Genome Res, 2001. **11**(12): p. 1979-87.
194. Wagner, D.S., et al., *Maternal control of development at the midblastula transition and beyond: mutants from the zebrafish II*. Dev Cell, 2004. **6**(6): p. 781-90.
195. Mullins, M.C., et al., *Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes*. Development, 1996. **123**: p. 81-93.
196. Connors, S.A., et al., *The role of tolloid/mini fin in dorsoventral pattern formation of the zebrafish embryo*. Development, 1999. **126**(14): p. 3119-30.
197. Schvarzstein, M., et al., *Expression of Zkrml2, a homologue of the Krml1/val segmentation gene, during embryonic patterning of the zebrafish (Danio rerio)*. Mech Dev, 1999. **80**(2): p. 223-6.
198. Thisse, B., Pflumio, S., Fürthauer, M., Loppin, B., Heyer, V., Degrave, A., Woehl, R., Lux, A., Steffan, T., Charbonnier, X.Q. and Thisse, C., *Expression of the zebrafish genome during embryogenesis*. ZFIN Direct Data Submission, 2001.
199. Job, C. and J. Eberwine, *Localization and translation of mRNA in dendrites and axons*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(12): p. 889-98.
200. Kunda, P., et al., *Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation*. J Neurosci, 2001. **21**(7): p. 2361-72.
201. Szallasi, Z., et al., *Non-equivalent roles for the first and second zinc fingers of protein kinase Cdelta. Effect of their mutation on phorbol ester-induced translocation in NIH 3T3 cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18299-301.
202. Yang, C., et al., *Rac-GAP-dependent inhibition of breast cancer cell proliferation by beta2-chimaerin*. J Biol Chem, 2005.

X- Abreviaturas y Glosario de Anglicismos

Abreviaturas y Glosario de Anglicismos (en orden de aparición):

DAG: Diacilglicerol
 PI: Fosfatidilinositol
 PIP₂: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
 IP₃: Inositol Trifosfato
 Ca⁺⁺: Calcio
 PKC: Proteína Quinasa C
 PLC: Fosfolipasa C
 PMA: 12-miristoilato 13-acetato de Forbol; también TPA: Tetradecanoil Acetato de Forbol
³HPDBu: ³H 12-13-dibutirato de Forbol
 C1-4: Dominios Conservados en las PKCs
 V1-5: Dominios Variables en las PKCs
 Zn⁺⁺: Zinc
 N-terminal: Amino-terminal
 GFP: Proteína Verde Fluorescente o Green Fluorecent Protein
 GEF: Factor Intercambiador de Nucleótidos de Guanidina
 GTP: Guanidina Trifosfato
 GDP: Guanidina Difosfato
 EF *hands*: “manos” EF, Dominios que unen calcio
 REM: Dominio Intercambiador de Ras
 MAPK: Proteínas Quinasas Activadas por Mitógenos
 BCR: *Breackpoint Cluster Region*
 GAP: Dominio Activador de la Actividad de GTPasa
 SH2: Dominio de homología con Src 2
 C-terminal: Carboxilo-terminal
 DH: Dominio de Homología a Dbl
 PH: Dominio de Homología a Pleckstrina
 GDI: Inhibidores de la Disociación de Nucleótidos de Guanidina
insert region: Secuencia de 12 aminoácidos característica de las proteínas de la familia de Rho ausente en la otras GTPasa de la súper-familia de Ras
 LPA: Ácido Lisofosfatídico
rufflings o *ruffles*: Replegamientos de membrana, lamedopodios dorsales que no están adheridos a sustrato
 MLC: Cadena Liviana de Miosina
 ROCK, ROK o Rok: Quinasa Activada por Rho
 mDia: Homólogo en Mamíferos de Diaphanous
 PAK: Quinasa Activada por p21
 dn: Forma Dominante Negativa
 ca: Forma Constitutivamente Activa
zebrafish: Pez Cebra, *Danio rerio*
screening: Investigar, revisar, *screening* genético se refiere a proceso de aislar mutantes/genes durante una mutagénesis a gran escala.
 hpf: Horas Post Fertilización
 dpf: Días Post Fertilización

splicing alternativo: Se refiere al procesamiento diferencial del ARN inmaduro que puede dar origen a diversos ARNm.

ARNm: ARN mensajero

trans-slicing: *Splicing* en trans

primer: Cebador, iniciador. Se refiere a un oligonucleótido utilizado para iniciar una reacción de transcripción.

MBT: *Midblastula Transition*, Momento del desarrollo embrionario donde se activa la transcripción de los genes zigóticos.

EST: *Expressed Sequence Tags*, Secuencias incompletas de ADN copia obtenidas al azar

cDNA: ADN copia

NCBI: National Center for Biotechnology Information

stop: Frenar, poner fin, parada. El *codón stop* se refiere al codón de frenado de la transcripción.

loop: Vuelta o lazo. En un péptido se refiere a una porción de secuencia sin estructura secundaria que por lo general flanquea dominios estructurales.

NIH: *National Institutes of Health*, Institutos de Salud de Estados Unidos de América

linker: Conector, vínculo. En un péptido se refiere a una porción de secuencia sin estructura secundaria que une dominios estructurales.

space filling: Una representación gráfica de una proteína del tipo *space filling* es aquella que muestra el espacio que ocupan sus nubes atómicas.

worm representation: Una representación gráfica de una proteína del tipo *worm representation* es aquella que muestra a la cadena polipeptídica como tubos o “gusanos”.

rmsd: *Root Mean Square Deviation*, valor estadístico que mide las diferencias entre distintas configuraciones.

wild type o wt: Forma salvaje

GST: Glutathion S-transferasa

PBD: Dominio de Unión a p21

EGF: Factor de Crecimiento Epitelial

FRET: Transferencia de Energía Fluorescente por Resonancia

YFP: Proteína Amarilla Fluorescente

CFP: Proteína Azul Fluorescente

EGFR: Receptor para el Factor de Crecimiento Epitelial

PAGE-SDS: Electroforesis en Geles de Acrilamida Desnaturalizantes (con SDS)

MALDI-MS: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*. Técnica de espectroscopia de masas para la identificación de proteínas.

G3BP: Proteína que se une a Ras-GAP también conocida como Rasputin en *Drosophila*.

RBD: Dominio de Unión a ARN

RRM: Dominio de Reconocimiento del ARN

TCR: Receptor de Células T

scaffold protein: Proteína adaptadora.

HA: Hemaglutinina

RGG: Dominios Ricos en Arginina

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

Gene Bank: Base de datos de secuencias nucleotídicas y proteicas

MO: Oligonucleótido Morfolínico

MOdes: Oligonucleótido Morfolínico Desapareado

knock-out: Se refiere a un animal al que se le quitó un gen o su función.

knock-down: Por analogía con *knock-out* se refiere a un animal en el que la expresión o actividad de un gen esta disminuida significativamente.

MHB: *Midbrain-Hindbrain Boundary* región limitada entre el cerebro medio y el cerebro posterior.

TB: *Tail-Bud* o yema caudal

PCP: *Pre Chordial Plate* o placa precordial

NCZ: *Non Convergence-extension Zone* o zona de no-convergencia y extensión.

cell fate: Destino celular, se refiere al tipo celular o tejido que dará origen una célula dada.

patterning: Establecimiento de un patrón de tipo celular o de tipo de tejido. También se refiere al establecimiento al patrón del plano corporal.

EVL: *Enveloping Layer* o capa envoltoria, se refiere a una capa de células que recubre el blastodermo.

YSL: *Yolk Syncytial Layer* o capa del sincitio del saco vitelino

turnover: Recambio. Se refiere al recambio de una proteína dependiendo de la estabilidad de la misma, la tasa de traducción, la cantidad de mensajero, etc.

Δ EIE: Mutante del dominio GAP al que se le eliminaron los aminoácidos glutamina, isoleucina y glutamina del sitio catalítico.

β GAP: Dominio de GAP de β -chimaerin

XI- Anexo

β2-chimaerin numero de acceso: L29126 [174]

GCTGTTGGCGTGAGTTGATCGAGCCGCAGCCGCAGCTCTCGCAGCTCAGCCTGGTAGACGTCT
 GCCAGCTTGGTGGGCTCCTTGGCCCGCAGCTGGTTTCAGCCTCAGCAGCCAGCGCCTTGTTTTG
 CTGTTCCAGGAAGCGAACCTTCTCGATGTAGCTGGCAAAGCGGTATTGAGCTCCATCATCTCT
 GCCCGCTCACTGGCCCGGGTCTCCTTGAAGCCAGCATTGAGTGCCCCAGCCAGGGAGAAATCC
 ACCCGGGTCCGAGTGGAGGGGGCATTTCGAGCCAGGGAGAGGGCGGGTGCAGGACCCAGACGGCG
 GCCAGGAGCCAGGCCCCACCATCATCTCCCTGAGGAGACGTAGGAGCGGCGAGCAGCGGA
 1 - GGTGATGCGTCTCCTCTCCAGCCTGTCCGGCTCGTCCGGTGTCTCCGATGCTGAAGAATA - 60
 - M R L L S S L S G S S V S S D A E E Y
 61 - CCAGCCTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAA - 120
 - Q P P I W K S Y L Y Q L Q Q E A P R P K
 121 - GAGAATCATTGTCTCGGGAGGTGGAAAACAGACCAAATATTATGGAAGAGAGTTTCA - 180
 - R I I C P R E V E N R P K Y Y G R E F H
 181 - TGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACAT - 240
 - G I I S R E Q A D E L L G G V E G A Y I
 241 - CCTTAGAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCA - 300
 - L R E S Q R Q P G C Y T L A L R F G N Q
 301 - GACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGAGGGAAACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGA - 360
 - T L N Y R L F H D G K H F V G E K R F E
 361 - GTCGATTGATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAACACTGTACATAGAAACAAAAGCTGC - 420
 - S I H D L V T D G L I T L Y I E T K A A
 421 - CGAGTACATTTCAAAAATGACAACCTAACCCCATCTATGAACACATTGGATATGCCACCCT - 480
 - E Y I S K M T T N P I Y E H I G Y A T L
 481 - ACTCAGAGAAAAAGTATCCAGAAGGCTGAGCAGGTCTAAAAATGAACCAAGAAAAACAAA - 540
 - L R E K V S R R L S R S K N E P R K T N
 541 - CGTCACACATGAAGAACACACAGCGGTGGAAAAGATCTCCTCCCTGGTTCGAAGGGCTGC - 600
 - V T H E E H T A V E K I S S L V R R A A
 601 - CCTCACACACAACGACAACCACCTTCAATTATGAGAAGACACACAACTTTAAGGTCCACAC - 660
 - L T H N D N H F N Y E K T H N F K V H T
 661 - GTTCCGAGGCCACACTGGTGTGAATATTGTGCCAATTTTCATGTGGGGGCTCATCGCCCA - 720
 - F R G P H W C E Y C A N F M W G L I A Q
 721 - AGGGGTCCGGTGTCTCAGACTGTGGATTGAACGTACACAAACAGTGTTCCAAGCACGTTCC - 780
 - G V R C S D C G L N V H K Q C S K H V P
 781 - CAATGACTGCCAACCTGATCTCAAGAGGATCAAGAAAGTGTACTGTTGTGACCTCACAAAC - 840
 - N D C Q P D L K R I K K V Y C C D L T T
 841 - ACTTGTGAAGGCTCACAACACTCAGAGACCCATGGTGGTAGACATATGCATTTCGGGAAAT - 900
 - L V K A H N T L Q R P M V D I C I R E I
 901 - TGAAGCAAGAGGATTAAAAATCGGAAGGCCCTTTACAGAGTCTCTGGGTTCACTGAACACAT - 960
 - E A R G L K S E G L Y R V S G F T E H I
 961 - TGAAGATGTCAAAAATGGCATTGACAGAGATGGTGAAGGCGGATATATCTGCCAATGT - 1020
 - E D V K M A F D R D G E K A D I S A N V
 1021 - CTATCCAGACATAAACATCATCACTGGAGCCCTTAAACTGTATTTTCAGAGACTTACCCAT - 1080
 - Y P D I N I I T G A L K L Y F R D L P I
 1081 - CCCTGTCATCACATATGATACCTATTCCAAATTTATAGATGCAGCAAAAATCTCCAATGC - 1140
 - P V I T Y D T Y S K F I D A A K I S N A
 1141 - AGATGAGAGGCTGGAAGCCGTCCATGAAGTGCTGATGCTGCTGCCTCCTGCCCACTATGA - 1200
 - D E R L E A V H E V L M L L P P A H Y E
 1201 - AACCTCCGGTACCTAATGATCCACCTCAAAAAGGTTACTATGAATGAAAAGACAATTT - 1260
 - T L R Y L M I H L K K V T M N E K D N F
 1261 - CATGAATGCAGAAAATCTGGGGATCGTGTGTTGGGCCCACTCTGATGAGGCCCCCTGAGGA - 1320
 - M N A E N L G I V F G P T L M R P P E D
 1321 - CAGCACCTGACCACCCTGCATGATATGCGGTACCAAAAAGCTGATTGTGCAGATTTTAAT - 1380
 - S T L T T L H D M R Y Q K L I V Q I L I
 1381 - AGAAAACGAAGACGTTTTATTCTAATCCAT - 1410
 - E N E D V L F *

β2-chimaerin numero de acceso: U28926 [52]

```

GGGCGTGCAAAGGCGCGGAGCGGGACGGAAACCACAAATAAATAGCGGCGGGCGG
CAGCGCGTCACTCTGGTGGAGCAGGAAGTGCAGGCAGAGTCCGGAGGCTGGTGTCTTCTGC
GCGTCCCCAGGACTTTGCCATGGGCTGGGGCCCGGGAGGCTGCGAGCGGCCGGGCGGAGG
GCAGCGGCGGGCGGCTCCCCACCGGGGCTGAGCGAGCAGCGACGCGAGGGGCGCGCGGAG
1 - ATGGCAGCGTCCAGCAACTCCAGCCTGTCCGGCTCGTCCGGTGTCTCCGATGCTGAAGAA - 60
- M A A S S N S S L S G S S V S S D A E E
61 - TACCAGCCTCCTATATGGAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCC - 120
- Y Q P P I W K S Y L Y Q L Q Q E A P R P
121 - AAGAGAATCATTTGTCTCCGGAGGTGGAAAACAGACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTT - 180
- K R I I C P R E V E N R P K Y Y G R E F
181 - CATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTAC - 240
- H G I I S R E Q A D E L L G G V E G A Y
241 - ATCCTTAGAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAAC - 300
- I L R E S Q R Q P G C Y T L A L R F G N
301 - CAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAAACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTT - 360
- Q T L N Y R L F H D G K H F V G E K R F
361 - GAGTCGATTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAACACTGTACATAGAAAACAAAAGCT - 420
- E S I H D L V T D G L I T L Y I E T K A
421 - GCCGAGTACATTTCAAAAATGACAACCTAACCCCATCTATGAACACATTGGATATGCCACC - 480
- A E Y I S K M T T N P I Y E H I G Y A T
481 - CTACTCAGAGAAAAGTATCCAGAAGGCTGAGCAGGCTCAAAAATGAACCAAGAAAAACA - 540
- L L R E A K V S R R L S R S K N E P R K T
541 - AACGTCACACATGAAGAACACACAGCGGTGGAAAAGATCTCCTCCCTGGTTCGAAGGGCT - 600
- N V T H E E H T A V E K I S S L V R R A
601 - GCCCTCACACACAACGACAACCACCTTCAATTATGAGAAGACACACAACCTTAAAGGTCCAC - 660
- A L T H N D N H F N Y E K T H N F K V H
661 - ACGTTCGAGGCCACACTGGTGTGAATATTGTGCCAATTTTCATGTGGGGGCTCATCGCC - 720
- T F R G P H W C E Y C A N F M W G L I A
721 - CAAGGGGTCCGGTGTCTCAGACTGTGGATTGAACGTACACAAACAGTGTTCGAAGCACGTT - 780
- Q G V R C S D C G L N V H K Q C S K H V
781 - CCCAATGACTGCCAACCTGATCTCAAGAGGATCAAGAAAGTGTACTGTTGTGACCTCACA - 840
- P N D C Q P D L K R I K K V Y C C D L T
841 - ACACCTGTGAAGGCTCACAACACTCAGAGACCCATGGTGGTAGACATATGCATTCCGGAA - 900
- T L V K A H N T Q R P M V V D I C I R E
901 - ATTGAAGCAAGAGGATTA AAAATCGGAAGGCCTTTACAGAGTCTCTGGGTTCACTGAACAC - 960
- I E A R G L K S E G L Y R V S G F T E H
961 - ATTGAAGATGTCAAAAATGGCATTGACAGAGATGGTGA AAAAGGCCGATATATCTGCCAAT - 1020
- I E D V K M A F D R D G E K A D I S A N
1021 - GTCTATCCAGACATAAACATCATCACTGGAGCCCTTAAACTGTATTTTCAGAGACTTACCC - 1080
- V Y P D I N I I T G A L K L Y F R D L P
1081 - ATCCCTGTCATCACATATGATACCTATTCCAAATTTATAGATGCAGCAAAAATCTCCAAT - 1140
- I P V I T Y D T Y S K F I D A A K I S N
1141 - GCAGATGAGAGGCTGGAAGCCGTCCATGAAGTGCTGATGCTGCTGCCTCCTGCCACTAT - 1200
- A D E R L E A V H E V L M L L P P A H Y
1201 - GAAACCCTCCGGTACCTAATGATCCACCTCAAAAAGGTTACTATGAATGAAAAGACAAT - 1260
- E T L R Y L M I H L K K V T M N E K D N
1261 - TTCATGAATGCAGAAAATCTGGGGATCGTGTGTTGGGCCCACTCTGATGAGGCCCCCTGAG - 1320
- F M N A E N L G I V F G P T L M R P P E
1321 - GACAGCACCTGACCACCTGCATGATATGCGGTACCAAAAAGCTGATTGTGCAGATTTTA - 1380
- D S T L T T L H D M R Y Q K L I V Q I L
1381 - ATAGAAAACGAAGACGTTTTATTCTAA - 1407
- I E N E D V L F *

```

β1-chimaerin

```

1 - ATGTTCTCTGAAGAACTGTGGCTGGAAAATGAGAAAAAGTGTGCTGTGGTTCGGAAGTCT - 60
  - M F S E E L W L E N E K K C A V V R K S
61 - AAGCAGGGCAGGAAACGCCAAGAAGTGTGGCCGTAGCCCTTCGGGGTGAAGGTGGGTGTC - 120
  - K Q G R K R Q E L L A V A F G V K V G V
121 - AAAGGCGGCTTTCTTTGGCCCCCTCTCAAACCTTTGCGCTGTTACAGATCTCCTCCCTG - 180
  - K G G F L W P P L K L F A C S Q I S S L
181 - GTTCGAAGGGCTGCCCTCACACACAACGACAACCACCTTCAATTATGAGAAGACACACAAC - 240
  - V R R A A L T H N D N H F N Y E K T H N
241 - TTTAAGGTCCACACGTTCCGAGGCCACACTGGTGTGAATATTGTGCCAATTTTCATGTGG - 300
  - F K V H T F R G P H W C E Y C A N F M W
301 - GGGCTCATCGCCCAAGGGGTCCGGTGTCTCAGACTGTGGATTGAACGTACACAAACAGTGT - 360
  - G L I A Q G V R C S D C G L N V H K Q C
361 - TCCAAGCACGTTCCCAATGACTGCCAACCTGATCTCAAGAGGATCAAGAAAGTGTACTGT - 420
  - S K H V P N D C Q P D L K R I K K V Y C
421 - TGTGACCTCACAACACTTGTGAAGGCTCACAACACTCAGAGACCCATGGTGGTAGACATA - 480
  - C D L T T L V K A H N T Q R P M V V D I
481 - TGCATTCCGGAAATTGAAGCAAGAGGATTAATAATCGGAAGGCCTTTACAGAGTCTCTGGG - 540
  - C I R E I E A R G L K S E G L Y R V S G
541 - TTCACTGAACACATTGAAGATGTCAAAATGGCATTGACAGAGATGGTAAAAGGCCGAT - 600
  - F T E H I E D V K M A F D R D G E K A D
601 - ATATCTGCCAATGTCTATCCAGACATAAACATCATCACTGGAGCCCTTAAACTGTATTTTC - 660
  - I S A N V Y P D I N I I T G A L K L Y F
661 - AGAGACTTACCCATCCCTGTCATCATATGATACCTATTCCAAATTTATAGATGCAGCA - 720
  - R D L P I P V I T Y D T Y S K F I D A A
721 - AAAATCTCCAATGCAGATGAGAGGCTGGAAGCCGTCCATGAAGTGCTGATGCTGCTGCCT - 780
  - K I S N A D E R L E A V H E V L M L L P
781 - CCTGCCCCTATGAAACCCTCCGGTACCTAATGATCCACCTCAAAAAGGTTACTATGAAT - 840
  - P A H Y E T L R Y L M I H L K K V T M N
841 - GAAAAAGACAATTTTCATGAATGCAGAAAATCTGGGGATCGTGTGTTGGGCCCACTCTGATG - 900
  - E K D N F M N A E N L G I V F G P T L M
901 - AGGCCCCCTGAGGACAGCACCCCTGACCACCCTGCATGATATGCGGTACCAAAAAGCTGATT - 960
  - R P P E D S T L T T L H D M R Y Q K L I
961 - GTGCAGATTTTAATAGAAAACGAAGACGTTTTATTCTAATCCAT - 1004
  - V Q I L I E N E D V L F *

```

dbEST Id: 9650130
EST name: 603080928F1
GenBank Acc: BI830814
Organism: [Homo sapiens](#)
Organ: brain
Tissue type: medulla

SEQUENCE TGGAAGCCCAAGGTGGGTGGATCGCTTGAGCCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAACA
 TGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGA
 GGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTTGTCTCGGGAGGTGGAAAACAGACCAAAATATTA
 TGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGT
 GGAGGGTGCCACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCT
 CAGGTTTGGAAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAAACACTTTGTGGG
 TGAGAAGAGGTTTGGATCGATTTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAACACTGTACAT
 AGAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTTCAAAAATGACAAC TAACCCCATCTATGAACACAN
 TGGATATGCCACCCTACTCAGAGAAAAAGTATCCAGAAGGCTGAGCAGGTCTAAAAATGA
 ACCAAGAAAAACAAACGTCACACATGAAGAACACACAGCGGTGGAAAAGTGTCTGGCTTA
 AAAGAAGACAGCTGGCTTCTCACATCTGCTCCTGTATTCAACCTGGGATATATCGTTTCAT
 TTGAAGTATAGGAAGAAGTCTGGCCTCACACAGATGTGTAGTTGGAAACATAGAGGAGTG
 TCTTATAGCCTTTTCAGGCAGGAAGTAGAGCCTGGGGCTGCTGAAGGCTTCGCGGCAACC
 GATAGAGCCTGAGAATGGAGCCTGGAGAAAAGTAGAGCCTGGAGATGGGGAGAGAGAAGTT
 GAGTCTGAAGGCTGATCTGAGCTTCTCGCGGAGTGCCCTTCAGCCAGCCCA

Translated:

1 - TGGAAGCCCAAGGTGGGTGGATCGCTTGAGCCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAACA - 60
 - G S P R W V D R L S P G V Q D Q P G Q H
 61 - TGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAAATCATACTTATATCAGTTACAGCAAGA - 120
 - D A E Y Q P P I W K S Y L Y Q L Q E
 121 - GGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTTGTCTCGGGAGGTGGAAAACAGACCAAAATATTA - 180
 - A P R P K R I I C P R E V E N R P K Y Y
 181 - TGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTCTTGGAGGCGT - 240
 - G R E F H G I I S R E Q A D E L L G G V
 241 - GGAGGGTGCCACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACACGCTGGCTCT - 300
 - E G A Y I L R E S Q R Q P G C Y T L A L
 301 - CAGGTTTGGAAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAAACACTTTGTGGG - 360
 - R F G N Q T L N Y R L F H D G K H F V G
 361 - TGAGAAGAGGTTTGGATCGATTTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGATAACACTGTACAT - 420
 - E K R F E S I H D L V T D G L I T L Y I
 421 - AGAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTTCAAAAATGACAAC TAACCCCATCTATGAACACAN - 480
 - E T K A A E Y I S K M T T N P I Y E H X
 481 - TGGATATGCCACCCTACTCAGAGAAAAAGTATCCAGAAGGCTGAGCAGGTCTAAAAATGA - 540
 - G Y A T L L R E K V S R R L S R S K N E
 541 - ACCAAGAAAAACAAACGTCACACATGAAGAACACACAGCGGTGGAAAAGTGTCTGGCTTA - 600
 - P R K T N V T H E E H T A V E K C L A *

Beta2 -----MRLSSLSGSSVSSDAEEYQPPIWKSYLYQLQQEAPRPKRIICPREVENRPKY
 Medula GSPRWVDRLSPGVQDQPGQHDAAEEYQPPIWKSYLYQLQQEAPRPKRIICPREVENRPKY
 ** ..:..... *****

Beta2 GREFHGIISREQADELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQTLNRYLFHDGKHFVG
 Medula GREFHGIISREQADELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQTLNRYLFHDGKHFVG

Beta2 EKRFES-----
 Medula EKRFESIHLVTDGLITLYIETKAAEYISKMTTNP IYEHXGYATLLREKVSRRLSRSKNE

dbEST Id: 16591508
EST name: ir58c06.y1
GenBank Acc: CA942461
Organ: Pancreas
Tissue type: Purified pancreatic islet

SEQUENCE CACGCGTCCGGTGAGTCACGGAGTGTGATCCCAGCATCAGCTGGGAACAGGTGGAAAACA
 GACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGC
 TTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCT
 ACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAAACAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGA
 AACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGTGATTCGATTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGA
 TAACACTGTACATAGAAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTTCAAAAATGACAAC TAACCCCA
 TCTATGAACACATTGGATATGCCACCCTACTCAGAGAAAAAGTATCCAGAAGGCTGAGCA
 GGTCTAAAAATGAACCAAGAAAAACAAACGTACACATGAAGAACACACAGCGGTGGAAA
 AGCTTCATCCCTGTTGTTGCAAATGGCAGGACCTCCCTTTTTTAATGCTGAAGTTCCATGT
 TTCATACCATTGTGGTCAGAAAAGATACCGCCCTAATATATGATCTGTCTGGAGAATAT
 TCCATGTATGCTCGA

Translation:

1 - CACGCGTCCGGTGAGTCACGGAGTGTGATCCCAGCATCAGCTGGGAACAGGTGGAAAACA - 60
 - V T E C D P S I S W E Q V E N R
 61 - GACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGC - 120
 - P K Y Y G R E F H G I I S R E Q A D E L
 121 - TTCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCTACATCCTTAGAGAAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCT - 180
 - L G G V E G A Y I L R E S Q R Q P G C Y
 181 - ACACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAAACAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGA - 240
 - T L A L R F G N Q T L N Y R L F H D G K
 241 - AACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTGTGATTCGATTCATGATCTGGTGACAGATGGCTTGA - 300
 - H F V G E K R F E S I H D L V T D G L I
 301 - TAACACTGTACATAGAAAACAAAAGCTGCCGAGTACATTTCAAAAATGACAAC TAACCCCA - 360
 - T L Y I E T K A A E Y I S K M T T N P I
 361 - TCTATGAACACATTGGATATGCCACCCTACTCAGAGAAAAAGTATCCAGAAGGCTGAGCA - 420
 - Y E H I G Y A T L L R E K V S R R L S R
 421 - GGTCTAAAAATGAACCAAGAAAAACAAACGTACACATGAAGAACACACAGCGGTGGAAA - 480
 - S K N E P R K T N V T H E E H T A V E K
 481 - AGCTTCATCCCTGTTGTTGCAAATGGCAGGACCTCCCTTTTTTAATGCTGAAGTTCCATGT - 540
 - L H P C C C K W Q D L P F * C * S S M F
 541 - TTCATACCATTGTGGTCAGAAAAGATACCGCCCTAATATATGATCTGTCTGGAGAATAT - 600
 - H T I V V R K D T A L I Y D L S W R I F
 601 - TCCATGTATGCTCGA - 615
 - H V C S X

Pancreas -----VTECDP-----SISWEQVENRPKYYGREFHG
 Beta2 MRLSSLGSSVSSDAEEYQPIWKSYLYQLQOEAPRPKRIICPREVENRPKYYGREFHG
 . * : * * . . :*****

Pancreas IISREQADELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQTLNYRLFHDGKHFVGEKRFES
 Beta2 IISREQADELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQTLNYRLFHDGKHFVGEKRFES

dbEST Id: 12366096
EST name: MR4-RT0048-070501-010-c02
GenBank Acc: BQ328172
Organ: kidney_tumor
Develop. stage: Adult

SEQUENCE AAAGTGCCTCGTCTGTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAGCG
 CTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGAGC
 ATCGGCGGGGTGCCATTTCAGGACTTACTTGCAAGCCCAGGATTTACATTTGGAAAGCGAG
 TGGTGTTTGATTCCCCTGTTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTTCCA
 GCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAATCATACTTATATCAGT
 TACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCTCGGGAGGTGGAAAACAGAC
 CAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCTTC
 TTGGAGGCGTGGAGGGTGCCACATCCTTAGAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTACA
 CGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAAAC
 ACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTCGAGTCGATTCATGATCTGGTGACAGAT

Translation:

1 - AAAAAGTGCCTCGTCTGTCCCAACCTCCTGGTCCCAGAAACCTGGCCGCATCAAGTCAG - 60
 - K S A S S C P N L L V P E T W P H Q V S
 61 - CGCTTCCCATGCTGGAAGAAGCAAGCAGCCCCAGGGTGAATCTTAAAAATTAATGAAGA - 120
 - A S H A G R S K Q P Q G G I L K I N E E
 121 - GCATCGGCGGGGTGCCATTTCAGGACTTACTTGCAAGCCCAGGATTTACATTTGGAAAGCG - 180
 - H R R G A I Q D L L A S P G F T F G K R
 181 - AGTGGTGTTTGATTCCCCTGTTTAAAAAGGCAACACACGTTTCGCTGATGGTCTACATTC - 240
 - V V F D S H C L K R Q H T F A D G L H S
 241 - CAGCTGCACTAGCGATGCTGAAGAATACCAGCCTCCTATATGGAATCATACTTATATCA - 300
 - S C T S D A E E Y Q P P I W K S Y L Y Q
 301 - GTTACAGCAAGAGGCACCTCGTCCCAAGAGAATCATTGTCTCGGGAGGTGGAAAACAG - 360
 - L Q Q E A P R P K R I I C P R E V E N R
 361 - ACCAAAATATTATGGAAGAGAGTTTCATGGGATCATCTCTCGGGAGCAGGCGGATGAGCT - 420
 - P K Y Y G R E F H G I I S R E Q A D E L
 421 - TCTTGGAGGCGTGGAGGGTGCCACATCCTTAGAGAAAGCCAGCGGCAACCAGGATGCTA - 480
 - L G G V E G A Y I L R E S Q R Q P G C Y
 481 - CACGCTGGCTCTCAGGTTTGGAAACCAGACCTTAAACTACAGGCTCTTCCACGACGGGAA - 540
 - T L A L R F G N Q T L N Y R L F H D G K
 541 - ACACTTTGTGGGTGAGAAGAGGTTTCGAGTCGATTCATGATCTGGTGACAGAT - 592
 - H F V G E K R F E S I H D L V T D X

TumorKidney KVRRRSNLRGPETWPHQVSASHAGRSKQPQGGILKINEEHRRGAIQDLLASPGFTFGKRV
 beta2 -----MR-----LLSSLG-----
 : * : * : *

TumorKidney VFDSHCLKRQHTFADGLHSSCTSDAEYQPPIWKSYLYQLQQEAPRPKRIICPREVENRP
 beta2 -----SSVSSDAEYQPPIWKSYLYQLQQEAPRPKRIICPREVENRP
 ** :*****

TumorKidney KYYGREFHGIISREQADELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQTLNYRLFHDGKH
 beta2 KYYGREFHGIISREQADELLGGVEGAYILRESQRQPGCYTLALRFGNQTLNYRLFHDGKH

TumorKidney FVGEKRFESIHDLVTDX
 beta2 FVGEKRFES-----

z-chimaerin numero de acceso: AY684586

```

1 - AGATGTCCACTTCATGCTGGGATGCAAGGAGTGAATCTGCGCTCCAGACTTCCAGACCTG - 60
61 - CAGCGAAAATACACACCCGCGCTCGACGCATCAGCAGGCGGTGAAAATCCGCCGCAAACCC - 120
121 - CGCTCACCTCTCCCCGTTTCCCGGCGCTCACAGTTTAGTTGTCCCTGTTAAAGTTGATCT - 180
181 - GCAACCGCCTGTAACACATCGCTTATGCAGGATTCAGACACCGGGCAATTCCTCCAAAACC - 240
241 - TCTCGTCCTTACAGTTTACGTTTATCCGTCATATAACCGGCTGCATTCTGTATGGAAAAG - 300
301 - CTGTGAGGATTTAAGGCGGGTCAATTGTTTATTTGTCTTCTTTGTCCGGCTGAATCACTGT - 360
361 - CTGCAATGGCCATCCATGTGTTTCGATAATGATGAGTACAGACCCCGGTGTGGAAATCCT - 420
      M A I H V F D N D E Y R P P V W K S Y
421 - ACTTGTATCAGCTGCAGCAGGAGGCGCCACATCCACGCAGAGTCACCTGCACATCAGAGG - 480
      L Y Q L Q Q E A P H P R R V T C T S E V
481 - TGGAGAATCGGCCAAGTACTACGGACGAGAGTATCATGGGTTGATCTCCAGAGAGGACG - 540
      E N R P K Y Y G R E Y H G L I S R E D G
541 - GGGACTGCTCAGTGTGGCTGAAGGAAGTTATCTGATCCGGGAGAGCCAGAGACAG - 600
      D L L L S V A E G S Y L I R E S Q R Q P
601 - CGGGCACATACACTTTAGCTCTACGCTTTGGGAATCAGACCCGAAACTTCCGCCCTCTTCT - 660
      G T Y T L A L R F G N Q T R N F R L F Y
661 - ACGACGGGAAGCATTTTGTGGGGGAGAAGAGATTCGAGTCGATCCACGACCTGGTGACAG - 720
      D G K H F V G E K R F E S I H D L V T D
721 - ATGGTCTGATCAGCTCTACATCGAGACCAAAGCAGCCGAGTACATCTCCAAGATGACCA - 780
      G L I T L Y I E T K A A E Y I S K M T I
781 - TCAACCCCATCTACGAGCATGTGGGCTACACCAGCTCAACCGCGAGCCAGCGCTCAAGA - 840
      N P I Y E H V G Y T T L N R E P A L K K
841 - AAACACTGCCCGTCTGTAAAGACCTGCCCGACGAAAACACTCGCCTGCAGAAGAGAGTG - 900
      T L P V C K D L P D G K H S P A E E S G
901 - GCCTGGAGGAAAGGCTCACGTGCTGGTCCGCCGAGCCACGCTGAAGGAGAGCGAACGCG - 960
      L E E R L T S L V R R A T L K E S E R V
961 - TGCCCAAATACGAGAAAGTCCACAACCTTCAAGGTGCACACCTTCAGAGGGCCACACTGGT - 1020
      P K Y E K V H N F K V H T F R G P H W C
1021 - GCGAGTACTGCGCCAACCTTCATGTGGGACTCATCGCTCAGGGAGTCAAATGTGCAGATT - 1080
      E Y C A N F M W G L I A Q G V K C A D C
1081 - GCGGCTGAATGTTTATAAGCAGTGCTCAAAGATGGTGGCCGAAACGACTGTAAGCCGGACC - 1140
      G L N V H K Q C S K M V P N D C K P D L
1141 - TGAAGCACGTGAAGAAGGTTTACAGCTGTGATCTGACCACGCTGGTCAAAGCCCACAACG - 1200
      K H V K K V Y S C D L T T L V K A H N A
1201 - CCAAACGACCCATGGTGGTGGACATGTGCATACGAGAGATCGAAGCACGAGGGTTGCAGT - 1260
      K R P M V V D M C I R E I E A R G L Q S
1261 - CGGAGGGTCTCTATCGCATCTCTGGATTCACTGACTTGATTGAAGACGTGAAGTTATCGT - 1320
      E G L Y R I S G F S D L I E D V K L S F
1321 - TTGACAGAGATGGAGAGAAGGCCGACATCTCAGTGAACGTGTATGAAGACATTAACGTGA - 1380
      D R D G E K A D I S V N V Y E D I N V I
1381 - TCAGCGGAGCTCTGAAACTGTACTTTAGGGACCTGCCGATCCCGTCCATCACCTACGACG - 1440
      S G A L K L Y F R D L P I P V I T Y D A
1441 - CTTATCCTCGCTTCATCCAGGCTGCCAAGCTGACAGATCCAGATGAGCGTCTGGAGGCTC - 1500
      Y P R F I Q A A K L T D P D E R L E A L
1501 - TTCATGAAGCTCTGAAGCTGCTTCCCTCTGCTCACTGTGAAACACTGCGATACCTCATGG - 1560
      H E A L K L L P P A H C E T L R Y L M A
1561 - CACACTTGAAGGGTCACTCAGAATGAGAAGGATAACCTGATGAACGCCGAAAACCTTG - 1620
      H L K R V T Q N E K D N L M N A E N L G
1621 - GGATCGTCTTTGGGCCGACTTTAATGCGGGCTCCAGACCTGGACGCCATGACGCTCTAA - 1680
      I V F F G P T L M R A P D L D A M T A L N
1681 - ACGACATCCGCTACCAGCGGCAGGTGGTGGAGCTGCTCATCAAAAATGAAGATATCCTCT - 1740
      D I R Y Q R Q V V E L L I K N E D I L F
1741 - TCTAGCACTGTTCCCTCAGACTCTGGA -1766
- *

```

z-Rac1 numero de acceso: AY682791

```

1 - ACTTTTCTCCGTCGAGTTTGAGCGAAATTCCTCATTCTGTGCGACTTCTATCGACTCCG - 60
-
61 - CTCTTGTTTTGCGTGTTGAATTGTGAGGGCGGGTGTCTCTGGCACAGCAGCTTTTATTGA - 120
-
121 - TTCATTACAGATACAGCTAGCGGGATAGCGTGCTAAACGAACACAGATGCAGGCCATAA - 180
-
181 - AGTGTGTGGTTCGTCGGGGACGGGGCTGTGGGAAAAACATGCCTTCTGATCAGCTACACCA - 240
- C V V V G D G A V G K T C L L I S Y T T
241 - CCAATGCTTTTCTGGGGAATACATTCCCACCTGTGTTTGATAATTATTCTGCAAATGTGA - 300
- N A F P G E Y I P T V F D N Y S A N V M
301 - TGGTCGATGGGAAACCAGTAAACCTGGGATTGTGGGATACAGCAGGACAAGAGGATTATG - 360
- V D G K P V N L G L W D T A G Q E D Y D
361 - ACAGGCTTCGACCGCTTTCCTACCCTCAGACGGATGTGTTTCCTGATCTGCTTCTCTTG - 420
- R L R P L S Y P Q T D V F L I C F S L V
421 - TGAGTCCGGCCTCATTGAAAACGTCCGTGCAAAGTGGTATCCGGAGGTCAGACATCATT - 480
- S P A S F E N V R A K W Y P E V R H H C
481 - GCCCTAACACTCCAATAATTCTTGTGGGACTAAGCTTGATTTGCGAGATGACAAGGACA - 540
- P N T P I I L V G T K L D L R D D K D T
541 - CCATCGAAAAGTTAAAGGAGAAGAACTCACTCCCATCACCTACCCTCAAGGCCTTGCTA - 600
- I E K L K E K K L T P I T Y P Q G L A M
601 - TGGCCAAAGAAATAGGAGCTGTGAAGTACCTGAAGTGCTCTGCCTTAACCCAACGCGGCC - 660
- A K E I G A V K Y L E C S A L T Q R G L
661 - TTGCTATGGCCAAAGAAATAGGAGCTGTGAAGTACCTGGAGTGCTCTGCCTTAACCCAAC - 720
- A M A K E I G A V K Y L E C S A L T Q R
721 - GCGGCCTTAAAACGTGTTTCGATGAAGCCATCCGTGCAGTGCTGTGTCCACCTCCGGTGA - 780
- G L K T V F D E A I R A V L C P P P V K
781 - AGAGGAGGAGGAGAAGATGTCTCCTTCTGTGA - 579
- R R R R R C L L L *

```