



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

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

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



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

MAXIMILIANO FRANCISCO FIGUEROA YÉVENES
CONCEPCIÓN-CHILE
2010

RESUMEN

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

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

