

03068



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONALES Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

REGULACION POR FOSFORILACION DE LA DEGRADACION
DE LA PROTEINA QUE UNE ACTINA, FILAMINA, POR
CALPAINA EN PLAQUETAS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A :
Q.F.B. MARIA ELIZABETH GARCIA PLASCENCIA



ASESOR: DR. DAVID J. JAY GOMEZ - FARIAS

MEXICO, D.F.,

2005

m344291



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CREDITOS

La parte experimental del presente estudio fue realizada en el Departamento de Biomedicina Cardiovascular (antes Cultivo de Tejidos) del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez bajo la tutoría del Dr. David J. Jay Gómez-Farías.

El Comité Tutorial asignado incluyó los siguientes participantes:

Nombre	Dependencia
Dra. Carmen Clapp Jiménez L.	Instituto de Neurobiología.
Dr. Mauricio Díaz Muñoz.	Instituto de Neurobiología.
Dr. Ataulfo Martínez Torres.	Instituto de Neurobiología.
Dr. Francisco Pellicer Graham.	Instituto Mexicano de Siquiatría.
Dr. David J. Jay Gómez-Farías.	Instituto Nacional de Cardiología, I. Ch.

Esta tesis fue apoyada en parte por los proyectos de CONACYT: 30558-M y U40188-Q.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirme caminar a su lado.

Deseo expresar my gratitud al Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Agradezco a mi esposo David por haberme guiado y apoyado durante la realización de este trabajo.

A mis padres quienes siempre me han brindado su apoyo y amor.

A mis hermanos: Rubén, Jaime, Jesús y Eduardo por que siempre cuento con ellos.

A mis compañeros de laboratorio: Miguel Angel y Ricardo por su ayuda, colaboración y amistad.

A la secretaria Angeles que siempre amablemente me ha ayudado.

Dedico esta tesis a mis hijos: David, Alan y Daniel por su amor, por el tiempo que he dedicado a este trabajo a expensas del que les debo a ellos. Los tres han sido mi motivación y espero que algún día se sientan orgullosos de mi labor.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCION	5
<i>Citoesqueleto</i>	7
<i>Filamina</i>	7
HIPOTESIS	15
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y METODOS	17
<u><i>Reacciones de PCR, mutagénesis dirigida con PCR, subclonación y expresión en E. Coli.</i></u>	17
<u><i>Detección de filamina en células endoteliales y plaquetas.</i></u>	17
<u><i>Experimentos de fosforilación in vitro.</i></u>	18
<u><i>Experimentos de clonación, mutagénesis dirigida, expresión de péptidos recombinantes en células de mamíferos y fosforilación in situ.</i></u>	18
<u><i>Obtención de plaquetas humanas y de células endoteliales de cordón umbilical humano.</i></u>	19
RESULTADOS	20
<u><i>Expresión y caracterización de los fragmentos recombinantes de la filamina.</i></u>	20
<u><i>Fosforilación de los fragmentos recombinantes por proteína cinasa dependiente de cAMP.</i></u>	23
<u><i>Protección por ciclosporina contra calpaina in situ.</i></u>	24
DISCUSION	27
ADENDUM	34
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS	38
APENDICE	43

RESUMEN

Las plaquetas humanas responden a diversos estímulos fisiológicos y exógenos dando como resultado cambios de forma y secreción celular. La respuesta también incluye activación de varias familias de cinasas y fosforilación de diversas proteínas incluyendo a la proteína que une actina filamina (proteína que une actina-280, ABP-280, o ABP, filamina no muscular). Se ha postulado que un proceso dinámico de fosforilación-defosforilación está involucrado en la organización de la arquitectura del citoesqueleto, en donde ABP juega un papel fundamental. Estudios previos mostraron que la fosforilación de la región C-terminal de la filamina por proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) refuerza la malla del citoesqueleto de actina protegiendo a la filamina contra la degradación proteolítica por calpaína. Con la idea de identificar los sitios funcionales importantes en ABP tres regiones C-terminales diferentes de la filamina fueron subclonadas y expresadas de manera efectiva en el sistema bacteriano *E. coli* BL21 (DE3), según se mostró por electroforesis en geles de poliacrilamida. De acuerdo con la secuencia predicha de aminoácidos de la proteína, uno de los fragmentos (residuos 1671-2647, 109 kDa) contenía un sitio de corte por calpaína y dos sitios potenciales de fosforilación por PKA (serina 2152 y treonina 2336). Un segundo fragmento (residuos 1671-2331, 74 kDa) contenía el sitio de corte por calpaína y uno de los tres sitios potenciales de fosforilación por PKA (serina 2152). El tercer fragmento (residuos 2223-2647, 48 kDa) contenía únicamente uno de los sitios potenciales de fosforilación por PKA (treonina 2336). La fosforilación de estos fragmentos indicó que solamente los péptidos que presentaban a la serina 2152 eran capaces de incorporar fosfato después del tratamiento con PKA. El análisis por mutagenesis dirigida confirmó que este residuo es el único sustrato para PKA en el extremo C-terminal de la

filamina. Estos resultados *in vitro* sugerían que un efecto similar podía esperarse en células intactas tratadas con agentes activadores de la PKA. Con la idea de enfatizar el uso de enzimas endógenas una región C-terminal (residuos 1671-2361, 79 kDa, incluyendo un péptido de fusión de 3.9 kDa contenido en el vector) que incluía a la serina 2152 y a la treonina 2336 se subclonó y expresó en las líneas celulares 293FT y COS-7. Los resultados mostraron que la incubación de las células en presencia de agentes que elevan el AMPc incrementaban la incorporación de ^{32}P en el fragmento. Así mismo, el análisis con mutagénesis dirigida mostró que la serina 2152 era el único sustrato en la región C-terminal de la filamina para PKA activada de manera endógena. Las implicaciones funcionales de la fosforilación de este residuo, que pertenece a un motivo serina-prolina, se discuten en términos del papel de la filamina en la reorganización del citoesqueleto de actina.

SUMMARY

Human platelets are responsive to various physiological and exogenous stimuli, resulting in shape change and secretion. The responses also include activation of several families of kinases and phosphorylation of a number of proteins including actin-binding protein (actin-binding protein-280, ABP-280 or ABP; nonmuscle filamin). It has been postulated that a dynamic phosphorylation-dephosphorylation process may be involved in the organization of the cytoskeleton architecture, in which ABP plays a pivotal role. Previous studies showed that phosphorylation of the C-terminal region of ABP by cAMP-dependent protein kinase (PKA) strengthens the actin cytoskeleton meshwork by protecting filamin against proteolytic cleavage by calpain. In an effort to identify the functionally significant phosphorylation sites in ABP three different C-terminal regions of human endothelial actin-binding protein-280 were subcloned and efficiently expressed in the *E. coli* BL21 (DE3) system as indicated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. As predicted by the aminoacid sequence of the protein one of the fragments, a 109 KD peptide (residues 1671-2647), contained a calpain cleavage site and two potential PKA phosphorylation sites (serine 2152 and threonine 2336). A second fragment, a 74 KD peptide (residues 1671-2331), contained a calpain cleavage site and one of the three presumptive PKA phosphorylation sites (serine 2152). The third fragment, a 48 KD peptide (residues 2223-2647), contained only one of the PKA sites (threonine 2336). Phosphorylation of these truncated peptides indicated that only the fragments containing serine 2152 incorporated phosphate after PKA treatment. Site-directed mutagenesis analysis confirmed that serine 2152 is the unique substrate for PKA in the C-terminal region of ABP. These *in vitro* results suggested that a similar effect might be expected in intact cells

treated with PKA activating agents. With the idea of emphasizing the use of endogenous enzymes a C-terminal region (residues 1671-2361, plus 3.9 KD from an N-terminal fusion peptide included in the expression plasmid) including the two potential PKA sites (serine 2152 and threonine 2336) was subcloned and expressed in 293FT and COS-7 cells. Results showed that incubation of cells in the presence of cAMP-elevating agents enhanced ^{32}P uptake into the fragment. Site-directed mutagenesis analysis confirmed that serine 2152 is the unique substrate in the C-terminal region of ABP for endogenously activated PKA. The functional implications of phosphorylation of this residue, which belongs to a serine-proline motif, are discussed in terms of the role of filamin in cytoskeleton reorganization.

INTRODUCCION

Tanto las plaquetas como otros tipos celulares entre los que destaca el endotelio vascular, responden a una gran variedad de estímulos fisiológicos y exógenos. La respuesta incluye cambios de forma y secreción de diversas sustancias entre otros fenómenos (Huang y Detwiler, 1986). En el caso de las plaquetas, por ejemplo, su función se define por dos estados fisiológicos. En su estado base la plaqueta presenta una forma discoide estable con la cual circula libremente en la vasculatura. En un segundo estado, en respuesta al daño vascular, las plaquetas rápidamente se convierten a su forma activa con filopodia y lamelipodia que derivan de la remodelación del citoesqueleto de actina que incluye el ensamblaje masivo de nuevos filamentos de actina (Hartwig 1999). En la figura 1 se muestra un esquema de la organización del citoesqueleto en las plaquetas. De esta manera, una función del citoesqueleto es dirigir por un lado los contornos de la membrana en la plaqueta no estimulada y por otro lado los rápidos cambios de forma en la plaqueta activada. Los cambios inducidos por la activación resultan de procesos como la fosforilación y/o la ruptura proteolítica por calpaína de proteínas del citoesqueleto (Fox 2001). La reorganización específica depende de la combinación de señales a las que la plaqueta esta expuesta. De esta manera, como se acaba de mencionar, estos cambios van acompañados de la activación de diversas familias de proteínas cinasas y la subsecuente fosforilación de un gran número de proteínas. A este respecto, estudios han mostrado que el citoesqueleto es un blanco principal de estas enzimas (Huang y Detwiler, 1986; Chen y Stracher, 1989; Wu y cols., 1994).

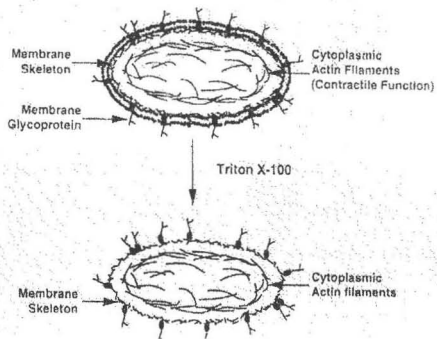
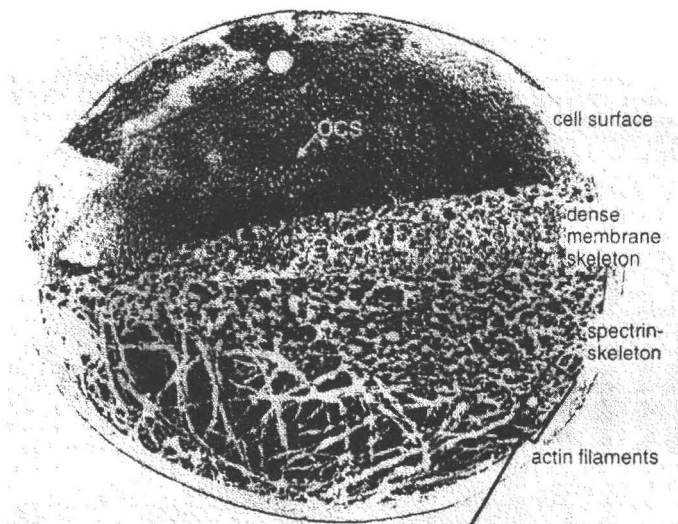


Figura1. Estructura del citoesqueleto en plaquetas.
 (Fox Joan E.B. (1993). The platelet cytoskeleton. *Thrombosis Haemostasis*. 70(6): 884-893).

Citoesqueleto. Las actividades del citoesqueleto dependen de tres tipos de filamentos, a saber: a) filamentos de actina (o microfilamentos) formados por monómeros de actina y proteínas accesorias entrecruzadoras de microfilamentos, b) microtúbulos formados por tubulina y proteínas accesorias de ésta como la proteína Tau; y c) filamentos intermedios que incluyen proteínas como la vimentina o la laminina. Cada uno de estos sistemas regula actividades fundamentales para la célula. De esta manera, los filamentos intermedios brindan soporte mecánico a la célula. Los microtúbulos representan centros primarios de organización del citoesqueleto y los microfilamentos de actina son esenciales para la manifestación de la motilidad celular especialmente para movimientos a nivel de membrana plasmática donde los filamentos se encuentran asociados de manera importante (Kreis y Vale, 1993). Además, recientemente se demostró que las funciones del citoesqueleto de actina están relacionadas con la actividad de miembros de la familia de pequeñas GTPasas como Ras (Hall, 1998; Ohta y cols., 1999). La interacción con estas proteínas asegura un control coordinado entre las funciones del citoesqueleto de actina y funciones celulares como la transcripción de genes y la manifestación de fenómenos de adhesión. El blanco primario de esta interacción se da en las proteínas entrecruzadoras de microfilamentos y está regulado por procesos finos que incluyen la modificación postraduccional por fosforilación y la degradación por proteasas específicas. Entre estas proteínas accesorias destaca la filamina.

Filamina. El ensamblaje y desensamblaje de los microfilamentos de actina son regulados por una variedad de moléculas que unen actina. La tabla I muestra una lista en donde se clasifica a estas proteínas de acuerdo a sus actividades (Posey et al, 2001). En lo que se refiere a la filamina en plaquetas (también llamada: filamina A, filamina no

muscular; ABP, actin-binding protein o ABP-280 ya que los monómeros pesan 280 kDa). ésta es un homodímero en donde cada subunidad esta constituida por 2647 aminoácidos correspondiendo a un peso molecular de 280 kDa. Los dominios funcionales de cada subunidad incluyen una región N-terminal de unión a actina filamentosa (F-actina) (“Actin-Binding Domain”, ABD), una región C-terminal de autounión y al menos una región, también C-terminal, de unión a glicoproteínas de membrana. El resto de la proteína esta constituida de 24 “repetidas” de 96 aminoácidos cada una en estructura beta plegada antiparalela. Además, hay un fragmento de 35 aminoácidos entre las repetidas 23 y 24 y un fragmento adicional entre las repetidas 15 y 16 los cuales son susceptibles a proteólisis por calpaína (Gorlin y cols., 1990) (Fig. 2). De entre las proteínas que actualmente se conocen que entrecruzan filamentos de actina. la filamina es sin duda la más potente en iniciar la gelación de los monómeros de actina. Además, es la principal proteína que une al citoesqueleto periférico de actina con la membrana celular a través de su dominio C-terminal de unión a glicoproteínas, como el receptor del factor von Willebrand GpIb-V-IX en plaquetas (Rao, 1999, Kreis y Vale, 1993 ; Gorlin y cols., 1990).

Tabla I.

Proteína	Activación y regulación
Profilina	Secuestro de monómeros de actina. Disociación de actina-G de la unión a PIP ₂ . Intercambio de nucleótidos.
Timosina β ₄	Secuestro de monómeros de actina. Disociación de actina-G de la unión a PIP ₂ .
Proteína Capping	Controla la longitud del filamento de actina por unión al extremo "barbed" (Capping) y previene la adición o pérdida de actina-G. Disociación de actina-F de la unión a PIP ₂ .
Gelsolina	Corte de los filamentos de actina y activada por unión a Ca ²⁺ . Capping de filamentos de actina. Disociación de actina-F de la unión a PIP ₂ . Nucleación de filamentos de actina, permite la elongación en el extremo "pointed".
Vilina	Corte de filamentos de actina a concentraciones elevadas de Ca ²⁺ . Entrecruzamiento (cross-linking) y formación de haces (bundling) a concentraciones bajas de Ca ²⁺ .
Fragmina, adseverina y seinderina	Corte de filamentos de actina y activada por unión a Ca ²⁺ . Capping de filamentos de actina. Disociación de actina-F de la unión a PIP ₂ .
Cofilina (ADF)	Desensamble de filamentos de actina, inhibida por fosforilación en serinas. Secuestro de monómeros de actina. Disociación de actina-G de la unión a PIP ₂ .
Complejo Arp2/3	Nucleación de filamentos de actina, permite la elongación en el extremo "barbed". Activada por la proteína WASP.
Ezrina, radixina, moesina	Entrecruzamiento (cross-linking) de actina-F con la membrana plasmática. Activada por PIP ₃ y por fosforilación de tirosinas y serinas.
Talina	Nucleación de filamentos de actina en la membrana.
Espectrina, fimbrina	Entrecruzamiento (cross-linking) y formación de haces (bundling) de filamentos de actina.
Filaminas	Entrecruzamiento (cross-linking) y formación de haces (bundling) de filamentos de actina. La unión a PIP ₃ inhibe su actividad.

ADF, Acting-depolymerizing factor (Factor despolimerizador de actina); PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato); WASP, Wiskott-Aldrich syndrome protein (Proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich).

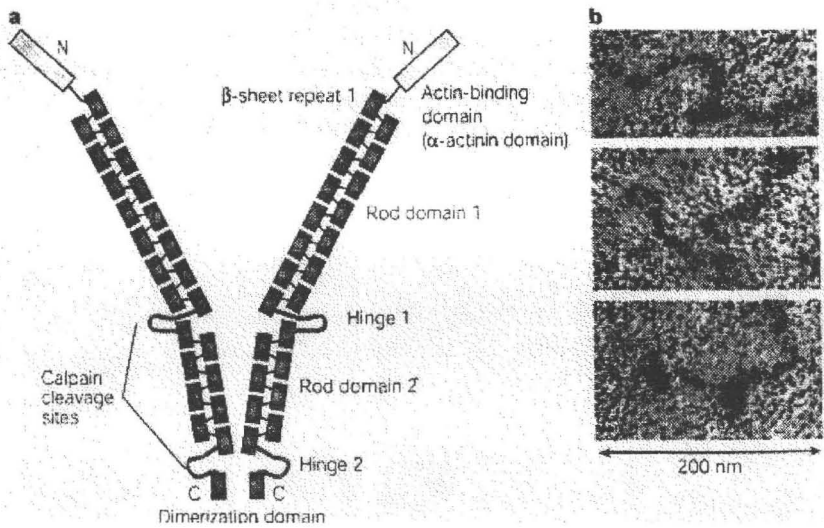


Figura 2. A) Estructura de la filamina humana FLNa. B) Micrografía electrónica de dímeros de FLNa de macrófagos de conejo (Stossel T.P., Condeelis J., Cooley L., Hartwig JH, Noegel A., Schleider M., Shapiro S.S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signaling. *Nature* 2, 138-145).

Estudios recientes también han mostrado una redistribución de la filamina expuesta a agentes que inducen la respuesta inflamatoria o agentes procoagulantes en plaquetas que inducen la respuesta inflamatoria o agentes procoagulantes en plaquetas (Wang y cols., 1996; Fox y cols., 2001; Hartwig y cols., 2001; Hartwig y col., 2003) y en células endoteliales desde la membrana celular hacia el citosol en respuesta a estímulos tan diversos como estrés oxidativo (Hastie y cols., 1997). Esta redistribución de filamina en plaquetas conlleva una desorganización de la malla periférica de actina con una subsecuente formación de huecos ("gaps") intercelulares y brotes membranales que explican en gran medida fenómenos tan importantes como el incremento en permeabilidad vascular o la formación de filopodia en plaquetas y la subsecuente retracción del coágulo (Hastie y cols., 1997b; Wang y cols., 1996). Por otro lado, se ha demostrado que agentes que estimulan a la adenilato ciclasa disminuyen la permeabilidad endotelial, inhiben la función plaquetaria y evitan en gran medida la reorganización del citoesqueleto de actina (Wu, Stracher y cols., 1994., Wang y cols., 1996 Hastie y cols., 1997 ; Wang y cols., 1996).

A este respecto, estudios previos han mostrado que la filamina, aislada de plaquetas humanas, es una mezcla de formas fosforiladas en distinto grado desde 18 hasta 40 moles de fosfato/ mol de monómero de ABP (Wu y cols., 1994). De hecho, se ha demostrado que la fosforilación/ defosforilación de la filamina es un evento importante involucrado en la reorganización del citoesqueleto de actina durante la activación plaquetaria (Chen y Stracher 1989 ; Wu y cols., 1994). Este proceso no solo modula la habilidad de la filamina de entrecruzar filamentos de actina (Jay y Stracher 1994) sino que también, disminuye la susceptibilidad de ésta a la degradación por calpaína (Chen y Stracher 1989 ; Wu y cols., 1994; Jay y Stracher 1997), una cisteín proteínasa dependiente de calcio cuya actividad da

cuenta de más del 95% del total de la actividad proteolítica de la plaqueta (Phillips y Jakabova, 1977; Truglia y stracher, 1981) y cuya presencia también ha sido demostrada en una gran diversidad de tejidos incluyendo el endotelio (Fujitani y cols., 1997). Cuando la secuencia completa de nucleótidos de la filamina fue deducida por Gorlin y cols., en 1990, el análisis de la secuencia de aminoácidos permitió predecir la existencia de múltiples sitios potenciales de fosforilación para diversas cinasas: tres sitios para proteína cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), treinta y tres sitios para proteína cinasa C (PKC), treinta sitios para caseína cinasa II (CCII) e inclusive un sitio para tirosina cinasa. De hecho, existen más de 380 residuos de serina/treonina en la filamina sobre la base de la secuencia predicha de aminoácidos.

Un hallazgo interesante fue que aunque la filamina aislada de plaquetas es una molécula ya fosforilada en alto grado, algunos de los sitios disponibles para fosforilación por PKA permanecían libres en la proteína nativa y brindaban protección contra la degradación por calpaína al ser fosforilados (Chen y Stracher 1989 ; Wu y cols., 1994 ; Jay y Stracher 1997), lo cual estaba de acuerdo con los datos mencionados previamente, que señalan que los agentes que estimulan a la adenilato ciclasa también evitan la reorganización del citoesqueleto de actina evitando cambios en permeabilidad vascular y activación plaquetaria. La calpaína degrada a la filamina (el sitio de corte ha sido localizado entre los residuos 1761 y 1762 (Gorlin y cols., en 1990) generando un fragmento N-terminal de 180 kDa y un fragmento C-terminal de 100 kDa que por acción prolongada de la calpaína puede originar un fragmento de 90 kDa y un péptido C-terminal de 10 kDa. Estudios previos (Jay y Stracher 1994) mostraron que la treonina en posición 167 estaba ya fosforilada en la filamina nativa y probablemente participaba en la interacción con la F-

actina. Por otro lado, cuando la proteína era protegida contra la acción de la calpaína, únicamente el extremo C-terminal de 100 kDa incorporaba la marca radioactiva (Chen y Stracher 1989) indicando que el sitio que brindaba la protección debía corresponder a alguna o las dos secuencias consenso restantes en la filamina para fosforilación por PKA (serina 2152 y/o treonina 2336).

Mediante la clonación y expresión en células de *Escherichia coli* de distintos dominios C-terminales de la filamina, en este trabajo se muestra que únicamente los fragmentos que contienen a la serina 2152 pueden incorporar marca radioactiva después de ser tratados con PKA. El análisis mediante mutagénesis dirigida confirmó que este residuo es el único sustrato para PKA en el extremo C-terminal de la proteína in vitro (Jay y cols. 2000, ver apéndice). La estimulación endógena de PKA mostró, así mismo, que este residuo puede ser un elemento de control importante cuando el citoesqueleto de actina se reorganiza en respuesta a estímulos fisiológicos (Jay y cols. 2003, ver apéndice). Un hallazgo muy interesante es que esta serina se encuentra adyacente a un residuo de prolina (prolina 2151). Motivos serina-prolina de este tipo han sido localizados en otras proteínas entre las que destaca Tau (que en pacientes con enfermedad de Alzheimer se encuentra formando precipitados hiperfosforilados en la corteza cerebral resistentes a degradación por calpaína) (Gustke y cols., 1992 ; Mandelkow y Mandelkow, 1993 ; Mandelkow y cols., 1996 ; Litersky y Johnson, 1992 ; Fleming y Johnson, 1995) o el factor nuclear de células T activadas (Rao y cols., 1997) NFAT, elemento fundamental para la expresión de la respuesta inmune en linfocitos T. La tesis de este trabajo es que el citoesqueleto de actina (microfilamentos), a través de la filamina en plaquetas y quizá otros tipos celulares, tiene un mecanismo de control por fosforilación/defosforilación en motivos serina-prolina que

determina la susceptibilidad de la proteína a degradación proteolítica por calpaina. La importancia de estos hallazgos dentro de la fisiología y patología celulares se discute.

HIPOTESIS

Se propone que mediante estudios de mutagénesis dirigida y fosforilación in vitro e in situ de péptidos recombinantes de la filamina, se podrá determinar cual de las secuencias potenciales de fosforilación por PKA en el extremo C-terminal protege a la filamina contra la degradación por calpaína.

OBJETIVOS

Identificar y caracterizar los sitios funcionales de fosforilación por PKA en el extremo C-terminal de la filamina involucrados en la protección contra degradación por calpaína.

De manera particular, clonar y expresar en sistemas bacterianos, que carecen de la maquinaria de fosforilación que caracteriza a las células eucariontes, distintas regiones del gen que pueden contener los sitios susceptibles de modificación por fosforilación.

Además, para confirmar su efectividad como sustratos de la cinasa dependiente de cAMP introducir mutaciones de sentido equivocado (“missense mutation”) en los sitios potenciales de fosforilación.

Así mismo, expresar peptidos nativos y mutados recombinantes en células superiores con la finalidad de mostrar que los sitios de fosforilación pueden ser un elemento de control importante cuando el citoesqueleto de actina se reorganiza en respuesta a estímulos fisiológicos.

Utilizar agentes dirigidos contra fosfatasas específicas para obtener información sobre los mecanismos moleculares que participan en la defosforilación de los dominios funcionales de la filamina.

Con este estudio se pretende avanzar en el conocimiento de las vías involucradas en la regulación de la organización del citoesqueleto de actina.

MATERIALES Y METODOS

Reacciones de PCR, mutagénesis dirigida con PCR, subclonación y expresión en E.

coli. Tres regiones C-terminales distintas del gen que codifica para ABP fueron subclonadas y expresadas en el sistema bacteriano de *E. coli* BL21 (DE3) (ver tabla II). Así mismo, la mutación de sentido equivocado Ser²¹⁵² → Ala (S2152A) fue introducida en el fragmento 1. La metodología para amplificar mediante PCR las distintas regiones del gen, la estrategia para subclonar y expresar en células de *E. coli* los distintos fragmentos, así como la manera para introducir la mutación S2152A se detallan en Jay y Cols. 2000 (apéndice de este trabajo).

Tabla II

Fragmento	Sección de ADN amplificada y tamaño en pares de bases	Región codificada (aminoácidos) y peso molecular en Kilo Daltones	Características particulares (Sitios de fosforilación por PKA-serina (S) 2152 y treonina (T) 2336- y presencia de sitio de corte por calpaína (Calp.), entre residuos 1761-1762)		
			S 2152	T 2336	Calp.
1	5183-8111, 2928 pb	1671-2647, 109 kDa	+	+	+
2	5183-7163, 1980 pb	1671-2331, 74 kDa	+	-	+
3	6839-8111, 1272 pb	2223-2647, 48 kDa	-	+	-

Detección de filamina en células endoteliales y plaquetas. Para la detección de la filamina, después de los experimentos, las células endoteliales y/o las plaquetas fueron disueltas en tampón de corrida con SDS para geles de poliacrilamida (SDS-PAGE, ver más abajo). Los péptidos fueron desplegados en SDS-PAGE al 8 %, electroforéticamente

transferidos a filtros de nitrocelulosa y revelados con anti-suero primario antifilamina seguido de anti-IgG secundario conjugado con peroxidasa. El anti-suero primario fue generado inmunizando conejos con el fragmento 2 de filamina recombinante obtenido según se indica en el párrafo anterior. Este anti-suero primario reaccionó con una proteína con peso molecular de 280 kDa que corresponde a la filamina y también con un péptido de 180 kDa que corresponde al fragmento N-terminal de ABP generado por acción de la calpaina. La SDS-PAGE se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli en 1970.

Experimentos de fosforilación in vitro. Los ensayos de fosforilación se llevaron a cabo en un tampón de Tris-Cl 10 mM, pH 8.0, conteniendo además cAMP 1 mM, MgCl₂ 1 mM, ATP 0.2 mM conteniendo (o no) [γ -³²P]ATP (0.1 mCi/nmol) y PKA 50 μ g a 37° C por 2 h. Las células de E.coli que expresan el fragmento recombinante de interés fueron lavadas dos veces en tampón STE (NaCl 0.1 M, Tris-Cl 10 mM, pH 8.0 y EDTA 1.0 mM). Las células se rompieron por sonicación en un disruptor sónico y por ciclos repetidos de congelación/descongelación. Después, la suspensión de células se centrifugó a 10.000 g por 15 min. para eliminar los restos celulares. El sobrenadante fue la fracción que se utilizó para los experimentos de fosforilación. Después de la fosforilación, la proteína se resolvió en SDS-PAGE al 8 %. Los geles se secaron y se expusieron para autoradiografía a un film Kodak X-OMAT por 6 h. a -70° C.

Experimentos de clonación, mutagénesis dirigida, expresión de péptidos recombinantes en células de mamífero y fosforilación in situ. Las particularidades de los experimentos en células superiores, así como los procedimientos de cultivo y propagación de estas células se detallan en Jay y Cols. 2004 (apéndice de este trabajo).

Obtención de plaquetas humanas y de células endoteliales de cordón umbilical

humano. Plaquetas frescas humanas fueron obtenidas del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología siguiendo básicamente la metodología indicada por Barber y Jamieson, 1970. Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) se obtuvieron por perfusión con colagenasa de venas umbilicales humanas y se identificaron por producción de factor von-Willebrand, todo de acuerdo con la metodología publicada previamente por Freshney (1994) (ver figura 3).

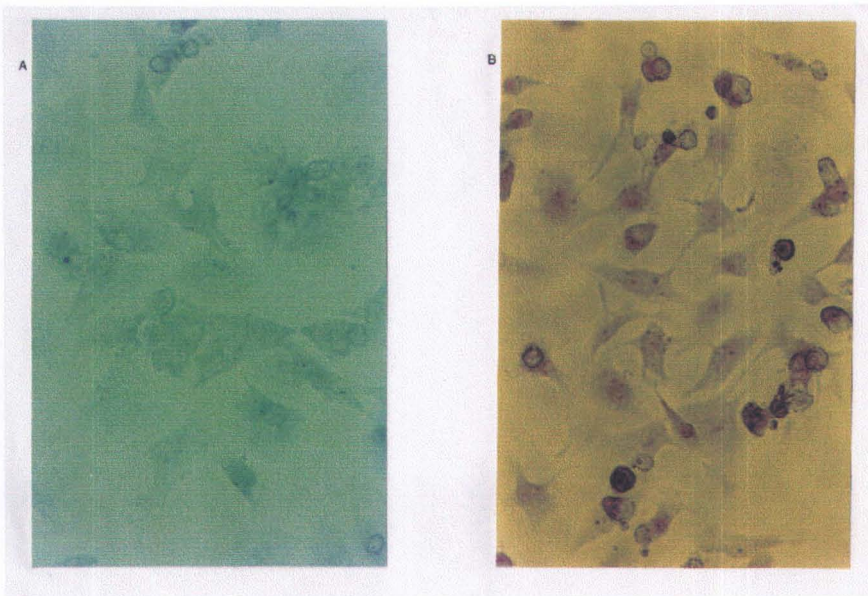


Figura 3. Células endoteliales de cordón umbilical humano en cultivo. En A se muestran, mediante microscopía de contraste de fases, células endoteliales en cultivo obtenidas por perfusión con colagenasa de vena umbilical humana (HUVEC). En B se muestra la imagen obtenida de HUVEC fijadas con ácido acético al 5 % en etanol y teñidas con anti-cuerpo monoclonal anti-von-Willebrand seguido de anti-IgG secundario unido a peroxidasa.

RESULTADOS

Expresión y caracterización de los fragmentos recombinantes de la filamina.

La figura 4 alinea el cDNA de la filamina (en donde se muestra la localización de sitios de restricción naturales importantes) con los dominios funcionales principales de la proteína. La figura también muestra las regiones del gen que fueron amplificadas mediante PCR y subclonadas en el vector pT7-7 para su expresión en células de *E. coli*. Asimismo, se muestra el sitio en donde se introdujo la mutación S2152A en el fragmento 1.

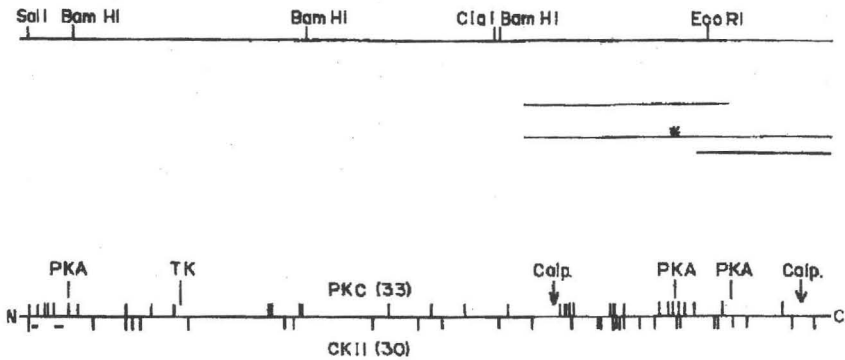


Figura 4. Secuencia del cDNA del gen de la filamina y de la proteína sintetizada. El diagrama alinea el cDNA del gen de la filamina con algunos de los dominios importantes de la proteína, incluyendo los sitios potenciales de fosforilación. En la línea superior se muestra la localización en el gen de sitios naturales de restricción importantes. Por debajo de la línea superior, se muestra la ubicación de los clones correspondientes a los fragmentos 2, 1 y 3 respectivamente. El asterisco muestra la localización de la mutación S2152A en el fragmento 1. Las dos líneas horizontales por debajo del extremo amino de la proteína representan secuencias potenciales de unión a actina. También se muestran los sitios de corte por calpaína (Calp.) que generan los fragmentos N-terminal de 180 kDa y C-terminal de 100 kDa que por acción prolongada genera fragmentos adicionales C-terminales de 90 y 10 kDa.

La expresión correcta de los fragmentos se confirmó mediante la secuenciación de los primeros aminoácidos (2 a los 14-17 residuos) en el extremo N-terminal de cada uno de los péptidos (ver apéndice). Así mismo, cada fragmento se utilizó para inmunizar conejos y generar tres anti-sueros distintos capaces de reaccionar cada uno de ellos con filamina electroforéticamente transferida a filtros de nitrocelulosa. El anti-suero obtenido a partir del fragmento 2 fue utilizado, como se muestra más adelante, en la identificación de la filamina en otro tipo de experimentos.

También se confirmó la presencia del sitio de corte por calpaína en los fragmentos 1 y 2. La incubación de estos fragmentos con 0.2 U de calpaína /ml indujo la acumulación de un fragmento de degradación que pesaba aproximadamente 11 kDa menos que el péptido original, lo cual está de acuerdo con la distancia existente entre el sitio de corte con calpaína (entre los residuos 1761 y 1762) y el extremo amino terminal (Fig. 5).

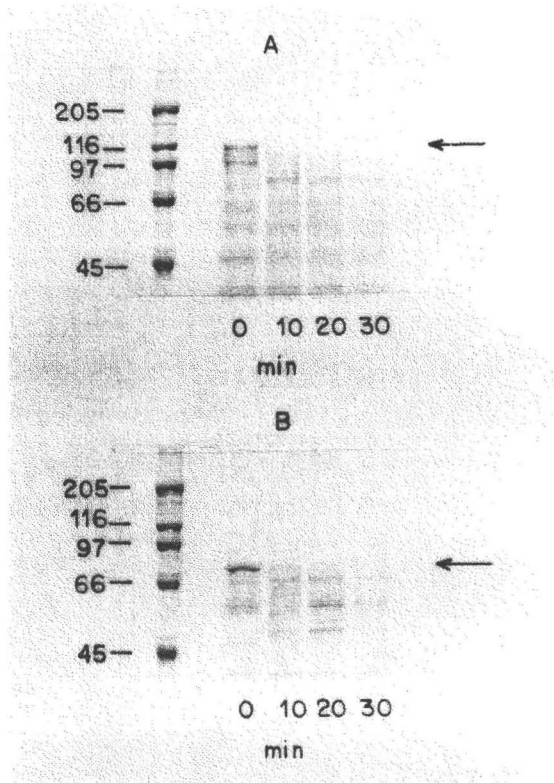


Figura 5. Degradación de los fragmentos 1 y 2 por calpaína. El fragmento 1 (A) y el fragmento 2 (B) fueron tratados con 0.2 U de calpaína/ml según se indica en Materiales y Métodos. Las muestras se retiraron a los 0, 10, 20 y 30 min. después de la adición de calpaína. La proteína se desplegó en SDS-PAGE al 8 % y se visualizó por tinción con azul de Coomassie. La posición de los marcadores de peso molecular se indica del lado izquierdo.

Fosforilación de los fragmentos recombinantes por proteína cinasa dependiente de cAMP. Estudios previos han mostrado que la PKA es capaz de fosforilar a la filamina tanto *in vitro* como *in situ* (Chen y Stracher 1989; Wu y cols., 1994; Jay y Stracher 1997). El sitio (ó sitios) de fosforilación que resultó en la estabilización de la filamina contra la degradación proteolítica por calpaína se encontraba en el fragmento C-terminal de 90 kDa producido junto con el fragmento N-terminal de 180 kDa por acción de la proteasa. El fragmento C-terminal fue el único capaz de incorporar marca radioactiva al ser incubado en presencia de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (Chen y Stracher 1989; Jay y Stracher 1997). A partir de estos estudios, sin embargo, no fue posible determinar cual de los dos sitios potenciales para fosforilación por PKA tenía que ser ocupado para brindar protección. Así mismo, no estaba claro cual podía ser el mecanismo molecular involucrado. Los resultados de este trabajo (ver Jay y Cols. 2000 en el apéndice) muestran que solo los fragmentos recombinantes que contienen a la serina 2152 (a saber, los fragmentos 1 y 2) pueden incorporar $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{Pi}$ indicando que este residuo es un sustrato eficiente para la PKA. Así mismo, la introducción de la mutación de sentido equivocado S2152A en el fragmento 1 evitó la incorporación de la marca radioactiva. Estos datos, junto con el hecho de que el fragmento 3 (que no contiene a la serina 2152) no incorpora Pi, confirmaron a la serina 2152 como el único blanco de fosforilación por PKA en el extremo C-terminal de la filamina. Estos resultados *in vitro* sugerían que un efecto similar podía esperarse en células intactas tratadas con agentes activadores de la PKA. Con la idea de enfatizar el uso de enzimas endógenas una región C-terminal (residuos 1671-2361, 79 kDa, incluyendo un péptido de fusión de 3.9 kDa contenido en el vector) que incluía a la serina 2152 y a la treonina 2336 se subclonó y

expresó en las líneas celulares 293FT y COS-7. Los resultados, detallados en el apéndice (Jay y Cols. 2004), mostraron que la incubación de las células en presencia de agentes que elevan el AMPc incrementaban la incorporación de ^{32}P en el fragmento. Así mismo, el análisis con mutagénesis dirigida mostró que la serina 2152 era el único sustrato en la región C-terminal de la filamina para PKA activada de manera endógena.

Una propiedad sobresaliente de la serina 2152 es que se encuentra adyacente a un residuo de prolina (prolina 2151). Estudios adicionales (Schutkowski y cols., 1998; Gotherl y Marahiel, 1999) han mostrado que motivos serina-prolina (S-P) de este tipo pueden regular funciones fundamentales en otras proteínas entre las que destaca Tau en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Gustke y cols., 1992; Mandelkow y Mandelkow, 1993; Mandelkow y cols., 1996; Litersky y Johnson, 1992; Fleming y Johnson, 1995) y el factor nuclear de células T activadas en linfocitos T (NFAT). De hecho, la acción inmunosupresora específica de la ciclosporina (CSP) depende de la unión, y subsecuente inhibición, del complejo CSP-ciclofilina a la fosfatasa (dependiente de calcio) calcineurina (CN) que normalmente se uniría a NFAT en una región reguladora invariable de este tipo: SPxxSPxxSP (Rao y cols., 1997). Con la idea de verificar que un mecanismo similar podía participar en la regulación de la filamina se decidió determinar si la CSP podía proteger a la filamina *in situ* contra la acción de la calpaína.

Protección por ciclosporina contra calpaína *in situ*. Se sabe que la filamina es digerida en minutos de una manera dependiente de calcio cuando plaquetas u otros tipos celulares, entre los que destaca el endotelio extraído de cordón umbilical humano (HUVEC), son incubados en presencia de calcio y un ionoforo de calcio (Bassé y cols., 1994; Fujitani y cols., 1997; Nachmias y cols., 1979). De acuerdo con estos estudios se

decidió realizar los experimentos cuyos resultados se muestran en la figura 6. Aquí se muestra el curso temporal de la proteólisis de la filamina tanto en plaquetas (Fig. 6A y B, Control) como en HUVEC (Fig. 6C y D, Control) que fueron incubadas en presencia de A23187. En ambos casos la filamina desapareció casi completamente a los 10 min. de incubación resultando en la rápida acumulación del producto de degradación N-terminal de la proteína. Esta proteólisis pudo ser prevenida completamente por la adición de 85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del inhibidor de calpaína I (Calp. I. Boehringer Mannheim), el cual es un inhibidor específico de calpaína permeable a la membrana celular, indicando que la proteasa responsable de la hidrólisis fue la calpaína, cuya actividad da cuenta del 95% de la actividad proteolítica total de la plaqueta y cuya presencia también ha sido demostrada en HUVEC (Fujitani y cols., 1997 ; Phillips y Jakabova, 1977 ; Truglia y Stracher, 1981) (Fig. 6A y C, Calp. I). La figura 6 también muestra que cuando las plaquetas (B. CS) o las HUVEC (D, CS) fueron tratadas, respectivamente, con 20 μM o 40 μM de CS por 10 min. antes de la adición del A23187, la filamina permaneció sin ser degradada totalmente por casi 30 min. El tiempo requerido para una hidrólisis completa de la filamina en estos experimentos varió desde unos cuantos segundos hasta algunos minutos dependiendo de las concentraciones de A23187 y de calcio extracelular utilizadas. En los experimentos mostrados se utilizaron 1 μM de A23187 y 0.5 mM de CaCl_2 . Estas condiciones permitieron observar claramente un contraste en la proteólisis de la filamina entre las muestras control y las plaquetas o las HUVEC tratadas con las concentraciones indicadas de CS o Calp. I.

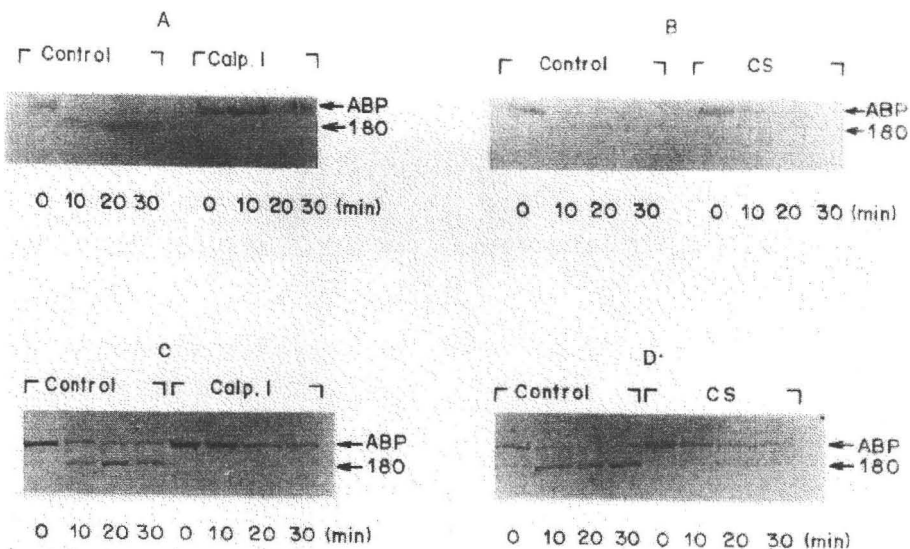


Figura 6. El inhibidor de calpaína I y la ciclosporina protegen a la filamina contra la degradación por calpaína. Plaquetas frescas humanas (3×10^8 plaquetas/ml) (A y B) o HUVEC (1×10^6 células/muestra) (C y D) fueron incubadas en un tampón que contenía NaCl 140 mM, KCl 5 mM, NaPO_4 10 mM, pH 7.4. Donde se indica, se añadió inhibidor de calpaína I (85 $\mu\text{g/ml}$) o 20 μM CS (plaquetas) o 40 μM CS (HUVEC) y las muestras se incubaron por 10 min. Después, se añadió CaCl_2 0.5 mM y A23187 1 μM y se retiraron alícuotas (3.0×10^8 plaqueta/ml) a los intervalos indicados debajo de cada carril. Las muestras fueron inmediatamente mezcladas con EDTA 10 mM y tampón de SDS para electroforesis y hervidas por 3 min. El tiempo = 0 significa que no se añadió calcio y A23187. Las muestras fueron inmunotransferidas y analizadas según se indica en Materiales y Métodos. Las flechas indican la posición de la filamina y del fragmento N-terminal de 180 kDa producido por degradación por calpaína.

DISCUSION

Estudios previos han mostrado que la filamina es una fosfoproteína con un contenido de fosfato de 18 a 40 moles de fosfato/mol de filamina (Wu y cols., 1994; Ohta y Hartwig, 1996). El análisis de la secuencia de aminoácidos ha revelado múltiples sitios potenciales para fosforilación por diversas cinasas : tres sitios para PKA, treinta y tres sitios para PKC, treinta sitios para caseína cinasa II e inclusive un sitio para tirosina cinasa. En su estado fosforilado la filamina no reacciona con PKC pero puede aún ser fosforilada por PKA y retiene su habilidad de organizar una red altamente estructurada de actina. Además, la fosforilación por PKA brinda una molécula resistente a la degradación por calpaína. En este caso, el sitio de fosforilación fue localizado en el extremo C-terminal de la proteína que fue el único que incorporó ^{32}P después de la fosforilación (Chen y Stracher 1989 ; Wu y cols., 1994 ; Jay y Stracher 1997). Los resultados del presente estudio, tanto in vitro como in situ, indican que la serina 2152 es el único residuo susceptible de fosforilación por PKA en esta porción de la proteína. Aunque el mecanismo protector contra la degradación por calpaína por fosforilación aún permanece sin resolverse, es notorio que esta serina se encuentre adyacente a un residuo de prolina (prolina 2151). Recientemente, se ha mostrado que los residuos de prolina brindan un elemento de control en muchas cadenas polipeptídicas al sufrir isomerización cis/trans. Además, la fosforilación de motivos serina-prolina o treonina-prolina brinda un sitio de regulación a este nivel al modular la actividad de isomerización (Schutkowski y cols., 1998 ; Gothel y Marahiel, 1999). Un ejemplo notable de este tipo de fosforilación dirigido por prolina se encuentra en la proteína asociada a mictotúbulos Tau que, en pacientes con enfermedad de Alzheimer, aparece en agregados precipitables hiperfosforilados resistentes a proteólisis por calpaína

(Gustke y cols., 1992; Mandelkow y Mandelkow, 1993; Mandelkow y cols., 1996; Litersky y Johnson, 1992; Fleming y Johnson, 1995). Otra característica interesante de este tipo de sitios de fosforilación es que la fosfatasa calcineurina (CN) regula su estado de fosforilación. De hecho, la reducción de la actividad de la CN en el cerebro lleva a un estado persistente de fosforilación de la proteína Tau (Garver, 1999 ; Lander, 1996).

Entre los agentes específicos para inhibir a la CN destaca la CS. La CS representa a un grupo relativamente nuevo de inmunosupresores con actividades distintas a las de otro tipo de compuestos. Debido a su habilidad de alterar de manera altamente selectiva la respuesta inmune celular y la mediada por anticuerpos, se ha convertido en la droga estándar para inhibir el rechazo de trasplantes alogénicos. El tratamiento con CS también se está usando de manera creciente en enfermedades que se presume están mediadas por la respuesta inmune (Borel y cols., 1989). La acción de la CS está mediada por la unión y subsecuente inhibición del complejo CS-ciclofilina (la ciclofilina es una peptidil-prolil cis-trans isomerasa) a la fosfatasa CN (Guerini, 1997). La CN es una treonina/serina fosfatasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina que se requiere para la defosforilación y subsecuente activación y translocación desde el citosol hacia el núcleo del "factor nuclear de células T activadas" (NFAT). En el núcleo este último inicia la transcripción de genes de citocinas y de otros genes (Rao y cols., 1997). La unión de la CN al NFAT en las células T está también dirigida a motivos serina-prolina localizados en el dominio regulador del factor nuclear (Rao y cols., 1997). Estudios recientes han mostrado que la inactivación de la CN por CS puede alterar un cierto número de funciones celulares distintas en un proceso que puede explicar, al menos en parte, los efectos tóxicos de la droga (Aramburu y cols., 1999). De esta manera, al utilizar a la CS como una prueba molecular ha sido posible definir no

únicamente los diferentes pasos involucrados en la respuesta inmune sino también, los mecanismos moleculares que regulan las interacciones de otros componentes celulares.

Los resultados del presente trabajo indican que la CS protege a la filamina contra la degradación por calpaína. Aún están por establecerse las implicaciones totales de estos hallazgos con relación a la regulación celular de la filamina y su interacción con otros sistemas moleculares. Estudios previos, sin embargo, demostraron la presencia en plaquetas de una fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina capaz de defosforilar a la filamina después de haber sido fosforilada por PKA. Se encontró que la filamina defosforilada era nuevamente susceptible a la degradación por calpaína (Chen y Stracher, 1989). Más recientemente, se ha documentado bien la presencia de la CN tanto en plaquetas como en HUVEC (Tallant y Wallace, 1985 ; Sakon y cols., 1990 ; Marsen y cols., 1995).

La importancia de estos resultados se aprecia mejor entendiendo el papel estabilizador que la filamina tiene en la membrana y la degradación que ésta sufre por calpaína durante la activación plaquetaria.

En este sentido, se ha presentado evidencia que indica que el citoesqueleto en las plaquetas estabiliza la membrana, evitando la liberación de microvesículas a partir de plaquetas no estimuladas (Fox y Cols. 1991). La filamina y la espectrina interaccionan con la membrana y es probable que estén involucradas en brindar soporte a ésta. En las células rojas sanguíneas, la importancia que la espectrina tiene en regular propiedades de la membrana ha sido demostrada por la existencia de defectos hereditarios en los cuales esta proteína es anormal. La identificación de pacientes con defectos en espectrina plaquetaria, sin embargo, no ha sido documentada (Fox 2001).

Por otro lado, distintas líneas de evidencia han demostrado la importancia que tiene la filamina en regular las propiedades de la membrana. Por ejemplo una línea celular de melanoma que carece de filamina muestra una estructura membranal anormal acompañada de protrusiones (Cunningham, 1992), mientras que células neuronales que carecen de ABP funcional muestran una migración anormal (Fox y Cols., 1998). Se cree que la importancia de la filamina en este sentido deriva, al menos en parte, de su habilidad de interactuar con componentes de la membrana, una suposición que ha encontrado sustento en la observación de que plaquetas provenientes de pacientes afectados con el síndrome de Bernard-Soulier (los cuales carecen o tienen algún defecto en el receptor del factor von Willebrand, GP Ib-V-IX (vWFR), complejo protéico que brinda el sitio principal de unión de ABP a la membrana de la plaqueta) son fácilmente deformables, frágiles, anormalmente grandes y circulan pobremente (George and Nurden, 1987).

La unión filamina-vWFR otorga una serie de propiedades estructurales al citoesqueleto de la plaqueta en reposo (Hartwig et al, 1999). En primer lugar, la alta densidad de vWFR en la superficie celular (25,000 copias por célula) asegura que la membrana plasmática este bien estabilizada mediante los filamentos de actina subyacentes unidos a través de la filamina. En segundo lugar, debido a que la unión filamina-vWFR pasa a través de los poros de la malla membranal de espectrina, restringe la expansión de la red de espectrina, evitando la formación de vesículas. En tercer lugar, induce la formación de arreglos lineales de vWFRs en la superficie celular, lo cual facilita la interacción del vWFR con al menos otros dos receptores ($Fc\gamma RIIA\gamma$ y α_{Ib}/β_3) que se sabe interactúan con él. Esta organización puede aumentar la cooperación entre receptores de manera importante. Por último, la unión filamina-vWFR mantiene a los filamentos cortos de la red de actina en

una posición cercana a la membrana en donde éstos sirven como centros de “nucleación” para el ensamblaje de nuevos filamentos de actina durante la formación de filopodia y lamelipodia subsiguiente a la activación plaquetaria.

Durante la activación plaquetaria, las plaquetas experimentan cambios muy rápidos en la cantidad de actina que es polimerizada para formar filamentos y en la organización de estos filamentos. La cantidad de actina que es polimerizada a filamentos es regulada en todo momento por la interacción de los monómeros de actina, y de los filamentos mismos de actina preexistentes, con una gran variedad de proteínas que: a) fragmentan filamentos e inhiben la polimerización de actina (Ej. gelsolina, CAPZ, adseverina o scinderina, tencina, timosina, aducina, etc.), b) inducen la polimerización de monómeros de actina o previenen la depolimerización de filamentos existentes (Ej. gelsolina- liberada de los filamentos deja centros de nucleación, filamina, espectrina, talina, α -actinina, profilina, Arp2/3, proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich-WASP, fosfoproteína estimulada por vasodilatadores-VASP, etc.) (Hartwig y cols., 2002).

Durante la activación plaquetaria, las interacciones entre estas proteínas están reguladas por la activación de enzimas específicas y la producción de segundos mensajeros. Algunas de las enzimas críticas para la inducción de la reorganización del citoesqueleto incluyen tirosina cinasas, serina/treonina cinasas, cinasas de lípidos, miembros de la familia Rho de GTPasas y la calpaína. En células intactas la comunicación entre las distintas rutas de señalización y los receptores resulta en la activación de redes metabólicas complejas cuyas consecuencias son difíciles de predecir en base únicamente a los elementos involucrados. Sin embargo, desde hace mucho tiempo se ha sabido de la importancia del calcio en la regulación de la reorganización del citoesqueleto. Proteínas reguladas por

elevaciones en la concentración de Ca^{2+} incluyen a la calmodulina, la gelsolina y la calpaína. Como se acaba de mencionar, la activación por calcio de la gelsolina juega un papel importante en la polimerización de la actina. Por otro lado, en las plaquetas hay muchas proteínas que unen calmodulina y ya se conoce desde hace algunos años de su importancia (Wallace et al, 1987).

En lo que se refiere a la calpaína, ésta es una de las proteínas más importantes en regular la reorganización del citoesqueleto. La calpaína es una tiol proteasa dependiente de calcio presente en el citosol de todos los tejidos animales estudiados hasta la fecha (Fox y cols. 1983, Phillips DR. y cols. 1977, Yuan y cols. 1997). Existen dos isoformas principales (μ -calpaína y m-calpaína) que difieren en la concentración de calcio necesaria para inducir su actividad en ensayos in vitro. Las plaquetas contienen principalmente μ -calpaína, la cual se activa cuando las plaquetas se agregan en respuesta a una gran variedad de estímulos fisiológicos (Fox y cols., 1983, Philips y cols., 1977., Yuan y cols., 1977). Se han identificado diversos substratos para la calpaína en plaquetas. De manera interesante muchos de éstos son proteínas del citoesqueleto principalmente: talina, ABP, espectrina proteína relacionada a la Distrofina (DRP) y proteína 4.1 cuya degradación es un prerrequisito indispensable para iniciar la reorganización del citoesqueleto asociada a la activación y agregación plaquetarias (Earnest y cols., 1995, Fox y cols., 1985, Fox y cols., 1987, Fox y cols., 1999).

Estudios previos han mostrado, a este respecto, que proteínas como la talina, la espectrina, la filamina o la DRP son blanco de modificación postraduccional por fosforilación, lo cual altera su estabilidad contra proteólisis por calpaína (Fox. 2001). De esta manera, proteínas del citoesqueleto que están involucradas en la polimerización y

reorganización del citoesqueleto de actina son reguladas por la activación de vías específicas de modificación postraduccionales.

En lo que se refiere a la filamina, los resultados de este trabajo ayudan a entender la manera en que la fosforilación de ABP por PKA estabiliza a la filamina contra la degradación proteolítica por calpaína cuando las plaquetas son inhibidas por agentes que incrementan la concentración de AMP cíclico. En el presente estudio se hizo uso de ensayos *in vitro* (Jay y Cols. 2000, ver apéndice) y también se enfatizó la importancia de enzimas endógenas en el diseño experimental (Jay y Cols., 2003). De esta manera, es razonable asumir que un proceso similar pueda ocurrir *in situ* bajo circunstancias adecuadas y por lo tanto pueda ser implicado como un medio de regulación importante que determine la estructura del citoesqueleto en respuesta a diversos estímulos fisiológicos. Estos resultados, así mismo, contribuyen al entendimiento de la manera en que señales inhibitorias para las plaquetas son retransmitidas mediante fosforilación dependiente de cAMP. Así, la filamina, a través de fosforilación por PKA en respuesta a agentes que elevan la concentración de cAMP e inhiben la función plaquetaria (como prostaciclina, PGI₂, o prostaglandina E1, PGE₁), experimentaría un cambio de conformación dando lugar a una estructura que es más resistente a degradación por calpaína brindando, de esta manera, un medio a nivel del citoesqueleto, para que las señales inhibitorias se contrapongan a la acción de las señales activadoras (como trombina, que elevaría la concentración de calcio y activaría fosfatasa (CN) y calpaína). De esta manera, la filamina intacta permanecería asociada a la malla de actina de forma más estrecha, haciendo a la red GP-Ib-ABP-actina, como un todo, más resistente a desorganización estructural, lo cual, en última instancia, es necesario para la reorganización del citoesqueleto que lleva a la extensión de filopodia. La proteólisis de la

filamina ocurriría en una etapa posterior durante la agregación plaquetaria. Esto ocurriría por defosforilación (por CN) y por activación de la calpaína durante el influjo de calcio que sigue a la activación de la plaqueta. Este argumento encuentra apoyo en observaciones previas que indican que la filamina es hidrolizada en presencia de anestésicos locales y esto está acompañado de una pérdida de la capacidad de las plaquetas de formar filopodia (Price y cols., 1987 y 1993). La activación de la calpaína puede brindar un mecanismo de control durante la retracción del coágulo. La hidrólisis de ABP podría permitir el desarreglo de los filamentos de actina y permitir la subsiguiente reorganización de éstos en “ramilletes” en los filopodia los cuales están involucrados en la retracción del coágulo.

ADENDUM

Por último, una observación relativamente reciente quizá merezca atención. Meyer y Cols. (1998) encontraron que la expresión de ABP en una línea de melanoma deficiente en filamina y que expresaba GP Ib-V-IX reestablecía la estabilidad de la membrana y la cantidad de GP Ib-V-IX que podía ser expresada en ésta aún cuando el dominio de ABP que interactúa con GP Ib-V-IX no estaba presente. De esta manera, ABP juega un papel importante en estabilizar la membrana y permitir la expresión eficiente de glicoproteínas de membrana por un mecanismo que no necesariamente involucra la interacción directa con GP Ib-V-IX. Se ha asumido que quizá ABP juegue un papel importante en reclutar moléculas o proteínas de señalización a una posición submembranal en donde sean críticas para la estabilidad de la membrana. Entre estos elementos se encuentran miembros de la familia Ras de GTPasas que de hecho interactúan con GP Ib a través de la proteína

adaptadora 14-3-3 y que son importantes para la regulación del citoesqueleto de actina y la expresión de factores nucleares como AP-1.

En este punto, y en relación con la acción de la ciclosporina observada en este trabajo, se pueden asumir múltiples implicaciones para la fisiología celular. En primer lugar, es interesante observar que mientras la expresión de genes dependiente de NFAT: AP-1 (AP-1, *fos/jun*, es un factor nuclear que actúa de manera coordinada con NFAT) es activada por CN, resulta inhibida por PKA (Negulescu y cols., 1994). Aún permanece por aclararse si estas acciones están ligadas y coordinadas con eventos en el citoesqueleto. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que ambos sistemas están regulados por mecanismos comunes incluyendo la participación de miembros de la familia Ras de GTPasas. Mientras las proteínas de tipo Ras se requieren para la expresión de AP-1, la regulación del citoesqueleto también depende de ellas (Schmidt y Hall, 1998). De hecho, Rac, Rho, Cdc42 y RalA se unen a la filamina y RalA induce la formación de filopodia (Ohta y cols., 1999). Los resultados del presente estudio junto con otros sugieren que NFAT y el citoesqueleto de actina, y quizá otros sistemas protéicos como Tau, podrían compartir un sistema de regulación común. La desorganización del citoesqueleto de actina inducida por degradación proteolítica dependiente de calcio y controlada por fosforilación/defosforilación en motivos serina-prolina facilitaría la liberación y/o interacción de proteínas reguladoras (Ras) con otros blancos celulares.

Finalmente, los resultados de este trabajo también sugieren que la CS puede influir en la acción de la calpaína al modificar sus substratos naturales. Se considera a la calpaína como una proteasa involucrada en eventos proteolíticos limitados relacionados a rutas de regulación y control más que a digestión irreversible (Croall y De Martino, 1991). De esta

manera, resultaría razonable evaluar el efecto de la CS en procesos tales como recambio de receptores, proteólisis limitada de cinasas y niveles de otras proteínas del citoesqueleto, eventos todos ellos, en donde se sabe que la calpaína juega un papel principal.

CONCLUSIONES

Se determinó que la serina 2152 es el único sitio de fosforilación por PKA en el dominio C-terminal de la filamina. Estudios previos han mostrado que la fosforilación de este residuo representa un evento significativo dentro de la fisiología celular ya que permite mantener una red compleja de filamentos de actina al estabilizar a la filamina contra la degradación proteolítica por calpaína. El hecho de que este residuo se encuentre formando parte de un motivo serina-prolina junto con el hallazgo de que la ciclosporina estabiliza a la filamina *in situ* contra la acción de la calpaína permiten suponer que la filamina puede estar regulada de manera similar y quizá coordinada con otros componentes celulares entre los que destacan NFAT y Tau. Se propone un mecanismo molecular común de regulación a través de fosforilación/defosforilación de motivos serina-prolina.

REFERENCIAS

- Aramburu, J., Yaffe, M.B., López-Rodríguez, C., Cantley, L.C., Hogan, P.G. and Rao, A. (1999). Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* **285**, 2129-2133.
- Barber, A.J. and Jamieson, G.A. (1970). Isolation and characterization of plasma membranes from human blood platelets. *J. Biol. Chem.* **245**, 6357-6365.
- Bassé, F., Gaffet, P. and Bienvenüe, A. (1994). Correlation between inhibition of cytoskeleton proteolysis and anti-vesiculation effect of calpeptin during A23187-induced activation of human platelets : are vesicles shed by filopod fragmentation ? *Biochim. Biophys. Acta* **1190**, 217-224.
- Borel, J.F., Padova, F.D., Mason, J., Quesniaux, V., Ryffel, B. and Wenger, R. (1989). Pharmacology of cyclosporine (sandimmune). *Pharmacol. Rev.* **41**, 239-422.
- Chen, M. and Stracher, A. (1989). In situ phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J. Biol. Chem.* **264**, 14282-14289.
- Croall, D.E. and DeMartino, G.N. (1991). Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* **71**, 813-847.
- Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH, Janmey PA, Byers HR, Stossel TP. (1992). Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science* Jan 17; **255(5042)**, 325-7.
- Earnest JP, Santos GF, Zuerbig S, Fox JE.(1995). Dystrophin-related protein in the platelet membrane skeleton. Integrin-induced change in detergent-insolubility and cleavage by calpain in aggregating platelets. *J Biol. Chem.* Nov 10; **270(45)**,27259-65.
- Fox JEB, Reynolds CC, Phillips DR. (1983). Calcium-dependent proteolysis occurs during platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* Aug 25; **258(16)**, 9973-81.
- Fox JEB.(1985). Identification of actin-binding protein as the protein linking the membrane skeleton to glycoproteins on platelet plasma membranes. *J. Bio. Chem.* Oct 5; **260(22)**, 11970-7
- Fox JEB, Reynolds CC, Morrow JS, Phillips DR.(1987). Spectrin is associated with membrane-bound actin filaments in platelets and is hydrolyzed by the Ca²⁺-dependent protease during platelet activation. *Blood.* Feb; **69(2)**, 537-45.
- Fox JEB (1999). Calpain in signal transduction. *Pharmacology and toxicology of calcium dependent protease.* Washington, D:C.: Taylor and Francis; 103-126.

- Fox Joan E.B. (2001). Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb. Haemost.* **86**, 198-213.
- Fox Joan E.B. (1993). The platelet cytoskeleton. *Thrombosis Haemostasis.* **70(6)**: 884-893.
- Fox, JEB, Austin CD.(1991). Evidence that agonist induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant containing microvesicles of aggregating platelets. *J. Biol. Chem.*, **226**, 13289-95.
- Fox Joan E.B. (2001). Cytoskeletal proteins and platelet signaling. *Thromb. Haemost.* **86**, 198-213.
- Faux, M.C., Rollins, E.N., Edwards, A.S., Langeberg. L.K., Newton. A.C. and Scott, J.D. (1999). Mechanism of A-kinase-anchoring protein 79 (AKAP79) and protein kinase C interaction. *Biochem. J.* **343 Pt 2**, 443-452.
- Fleming, L.M. and Johnson, G.V. (1995). Modulation of the phosphorylation state of tau in situ : the roles of calcium and cyclic AMP. *Biochem. J.* **309 (Pt 1)**, 41-47.
- Freshney, R.I. (1994) Culture of specific cell types. Endothelium. *In Culture of animal cells. A manual of basic technique.* Third edition (Wiley-Liss, Eds.), pp. 333-334, A John Wiley & Sons, INC., Publication, New York.
- Fujitani, K., Kambayashi, J., Sakon, M., Ohmi, S.I., Kawashima ,S., Yukawa, M., Yano, Y., Miyoshi, H., Ikeda, M., Shinoki, N. and Monden, M. (1997). Identification of mu-, m-calpains and calpastatin and capture of mu-calpain activation in endothelial cells. *J Cell Biochem.* **66**, 197-209.
- Garver, T.D., Kincaid, R.L., Conn, R.A. and Billingsley, M.L. (1999). Reduction of calcineurin activity in brain by antisense oligonucleotides leads to persistent phosphorylation of tau protein at Thr181 and Thr231. *Mol. Pharmacol.* **55**, 632-641.
- George JN, Rosa J P, George. D F Bainton. A T Nurden , J P Caen , and McEver R P.(1987). Gray platelet syndrome. Demonstration of alpha granule membranes that can fuse with the cell surface. *J. Clin. Invest.* October; **80(4)**: 1138-1146
- Gorlin, J.B., Yamin, R., Egam, S., Stewart, M., Stossel, T.P., Kwiatkowski, D.J. and Hartwig, J.H. (1990). Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin) : a molecular leaf spring. *J. Cell. Biol.* **111**, 1089-1105.
- Gothel, SF., and Marahiel, MA. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 423-436.

Guerini D (1997) Calcineurin : not just a simple protein phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 271-275.

Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins (1993) (Kreis, T. and Vale R., eds.) Sambrook & Toozee Publication, Oxford University Press, New York.

Gustke, N., Steiner, B., Mandelkow, EM., Biernat, J., Meyer, HE., Goedert, M., and Mandelkow, E. (1992). The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.* **307**, 199-205.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.

Hastie, L.E., Patton, W.F., Hechtman, H.B., Shepro, D. (1997a). H₂O₂-induced filamin redistribution in endothelial cells is modulated by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. : *J. Cell. Physiol.* **172**, 373-81.

Hastie, L.E., Patton, W.F., Hechtman, H.B., Shepro, D. (1997b). Filamin redistribution in an endothelial cell reoxygenation injury model. *Free. Radic. Biol. Med.* **22**, 955-66.

Hartwig JH, Barkalow K, Azim A, Italiano J. The elegant platelet: signals controlling **actin** assembly.(1999). *Thromb. Haemost.* Aug; **82(2)**:392-8

Hartwig JH., Falet H., Hoffmeister KM. (2002). Normal asp 2/3 activation in platelets lacking WASp. *Blood Sep.*15; 1006 2113-2122.

Hartwig JH., Italiano JE., Bergmeier W., Tiwari S., Falet H., Hoffmeister KM., Andre P., Wagner DD., Shivdasani RA. (2003). Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood.* Jun. 15;**101(12)**; 4789-4796.

Huang, E.M. and Detwiler, T.C. (1986) in *Biochemistry of Platelets* (Phillips, D.R. and Shuman, M.A., eds.) pp.1-68, Academic Press, New York.

Jay, D. and Stracher, A. (1994). Expression in Escherichia coli and phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase of the N-terminal region of human endothelial actin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* **202**, 764-771.

Jay, D. and Stracher, A. (1997). Expression in Escherichia coli, phosphorylation with cAMP-dependent protein kinase and proteolysis by calpain of a 71-KDa domain of human endothelial actin-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 555-558.

Klauck, T.M., Faux, M.C., Labudda, K., Langeberg, L.K., Jaken, S. and Scott, J.D. (1996). Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science* **271**, 1589-1592.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lander, C.J., Czech, J., Maurice, J., Lorens, S.A. and Lee, J.M. (1996). Reduction of calcineurin enzymatic activity in Alzheimer's disease: correlation with neuropathologic changes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55**, 924-931.

Litersky, J.M. and Johnson, G.V. (1992). Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. *J. Biol. Chem.* **267**, 1563-1568.

Mandelkow, E.M. and Mandelkow, E. (1993). Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci.* **18**, 480-483.

Mandelkow, E.M., Schweers, O., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Trinczek, B. (1996). Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci.* **777**, 96-106.

Marsen, T.A., Simonson, M.S. and Dunn, M.J. (1995). Thrombin-mediated ET-1 gene regulation involves CaM kinases and calcineurin in human endothelial cells. : *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**, S1-4.

Meyer SC, Sanan DA, Fox JE. (1998). Role of actin-binding protein in insertion of adhesion receptors into the membrane. *J Biol Chem.* Jan 30; **273(5)**, 3013-20.

Nachmias, VT., Sullender, JS. and Fallon, J.R. (1979). Effects of local anesthetics on human platelets: filopodial suppression and endogenous proteolysis. *Blood* **53**, 63-72.

Negulescu, P.A., Shastri, N. and Cahalan, M.D. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2873-2877.

Ohta, Y. and Hartwig, J.H. (1996). Phosphorylation of actin-binding protein 280 by growth factors is mediated by p90 ribosomal protein S6 kinase. : *J. Biol. Chem.* **271**, 11858-11864.

Ohta, Y., Suzuki, N., Nakamura, S., Hartwig, J.H. and Stossel, T.P. (1999). The small GTPase RalA targets filamin to induce filopodia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2122-2128.

Phillips, D.R. and Jakabova, M. (1977). Ca^{2+} -dependent proteases in human platelets. Specific cleavage of platelet polypeptides in the presence of added Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* **252**, 5602-5605.

Price MG.,(1987). Cytoskeletal proteins located at the periphery of M-discs in mammalian striated muscle. *J. Cell Biol.* **104**, 1325-1336.

Price MG., Gomer RH., (1993). Skelemin, a cytoskeletal M-disc periphery protein, contains motifs of adhesion/recognition and intermediated filament proteins. *J. Biol. Chem.* **268**,

21800-21810.

Rao, A., Luo, C. and Hogan, P.G. (1997). Transcription factors of the NFAT family : regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707-747.

Sakon, M., Kambayashi, J., Kajiwara, Y., Uemura, Y., Shiba, E., Kawasaki, T. and Mori, T. (1990). Platelet protein phosphatases and their endogenous substrates. *Biochem. Int.* **22**, 149-161.

Schmidt, A. and Hall, M.N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 305-338.

Schutkowski, M., Bernhardt, A., Zhou, XZ., Shen, M., Reimer, U., Rahfeld, JU., Lu, KP., and Fischer, G. (1998). Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition. *Biochemistry* **37**, 5566-5575.

Stossel T.P., Condeelis J., Cooley L., Hartwig JH, Noegel A., Schleider M., Shapiro S.S. (2001). Filamins as integrators of cell mechanics and signaling. *Nature* **2**, 138-145.

Tallant, E.A. and Wallace, R.W. (1985). Characterization of a calmodulin-dependent protein phosphatase from human platelets. *J. Biol. Chem.* **260**, 7744-7751.

Truglia, J.A. and Stracher, A. (1981). Purification and characterization of a calcium dependent sulfhydryl protease from human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 814-822.

Wallace RW., Tallant EA. McManus MC. (1987). Human platelet calmodulin binding proteins: identification and Ca²⁺ dependent proteolysis upon platelet activation. *Biochemistry* **26**, 2766-2773.

Wang, Q., Patton, W.F., Chiang, E.T., Hechtman, H.B., Shepro, D. (1996). Filamin translocation is an early endothelial cell inflammatory response to bradykinin: regulation by calcium, protein kinases and protein phosphatases. *J. Cell. Biochem.* **62**, 383-96

Yuan Y, Dopheide SM, Ivanidis C, Salem HH, Jackson SP. (1997). Calpain regulation of cytoskeletal signaling complexes in von Willebrand factor-stimulated platelets. Distinct roles for glycoprotein Ib-V-IX and glycoprotein IIb-IIIa (integrin alphaIIb beta3) in von Willebrand factor-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* Aug 29; **272(35)**:21847-54.

Wu, M.P., Jay, D. and Stracher, A. (1994). Existence of multiple phosphorylated forms of human platelet actin-binding protein. *Cell. and Mol. Biol. Res.* **40**, 351-357.

APENDICE :

Artículos publicado durante la realización de la Tesis



Determination of a cAMP-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Site in the C-Terminal Region of Human Endothelial Actin-Binding Protein

David Jay,¹ Elizabeth J. García,² José Enrique Lara,³ Miguel Angel Medina,⁴ and María de la Luz Ibarra

Departamento de Cultivo de Tejidos, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Juan Badiano # 1, CP 14080, México, D. F. México

Received September 10, 1999, and in revised form January 27, 2000

Three different C-terminal regions of human endothelial actin-binding protein-280 (ABP-280 or ABP; non-muscle filamin) were subcloned and efficiently expressed in the *Escherichia coli* BL21 (DE3) system as indicated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. As predicted by the amino acid sequence one of the fragments, a 109-kDa peptide (residues 1671–2647), contained a calpain cleavage site and two potential cAMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylation sites (serine 2152 and threonine 2336). A second fragment, a 74-kDa peptide (residues 1671–2331), contained a calpain cleavage site and one of the three presumptive PKA phosphorylation sites (serine 2152). The third fragment, a 48-kDa peptide (residues 2223–2647), contained only one of the PKA sites (threonine 2336). Phosphorylation of these truncated peptides indicated that only the fragments containing serine 2152 incorporated phosphate after PKA treatment. Site-directed mutagenesis analysis confirmed that serine 2152 is the unique substrate for PKA in the C-terminal region of ABP. The functional significance of phosphorylation of this residue, which belongs to a serine-proline motif, is discussed. © 2000 Academic Press

Key Words: actin-binding protein-280; nonmuscle filamin; calpain; protease; cAMP-dependent protein kinase; serine-proline motif.

Actin-binding protein-280 molecules (ABP-280 or ABP; nonmuscle filamin) are homodimers with polypeptide subunit chains of 2647 amino acids, corresponding to 280 kDa. The functional domains of each subunit include an F-actin binding region, a self-association domain, and a membrane glycoprotein binding region (1). In platelets ABP is an important component of the cytoskeleton, where it promotes rearrangement of actin filaments in response to a variety of physiological and exogenous stimuli. Previous studies indicated that a dynamic phosphorylation/dephosphorylation process may modulate the interaction of ABP with other cytoskeletal elements. Dephosphorylation of ABP regulates its ability to organize F-actin into a highly cross-linked network within the cell, whereas phosphorylation of the native protein by cAMP-dependent protein kinase (PKA) strengthens this structural framework by protecting the molecule against proteolytic cleavage by calpain (2–5). In this case the phosphorylation site lies in the 90-kDa carboxy-terminal fragment, the smaller of the two fragments produced by calpain cleavage.

In this regard, the analysis of the amino acid sequence of ABP (1) revealed multiple consensus sequences specific for diverse kinases including three sites for PKA at residues 167, 2152, and 2336, whereas the calpain cleavage site has been localized to residues 1761–1762. From previous studies (4) the threonine at position 167 appears to already be phosphorylated in native ABP, whereas the remaining one or two potential PKA sites appear to be free in the molecule and confer proteolytic stability upon becoming phosphorylated (3–5).

In an effort to identify the functionally significant phosphorylation sites in ABP we have cloned and ex-

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: (52) 5573-0926. E-mail: jay@mailier.main.conacyt.mx.

² Current address: UACP y P del CCH, Universidad Nacional Autónoma de México.

³ Current address: Department of Gynecology, Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubiran.

⁴ Current address: Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México.

pressed in *Escherichia coli* regions of the molecule, which may contain such sites. Thus, we recently informed about successfully cloning the N-terminal region of the molecule, which contains a PKA site probably involved in F-actin interaction (4). We also have generated a C-terminal fragment, which contained the calpain cleavage site and two consensus PKA sequences discussed previously (5). We now report the generation of different fragments which confirm serine 2152 as the only phosphorylation site in the C-terminal region of ABP. This residue is part of a serine-proline motif and the biological significance of its phosphorylation is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Materials. *DpnI* restriction endonuclease was supplied by Stratagene. All other restriction endonucleases were obtained from New England Bio Labs. Shrimp alkaline phosphatase and Rapid DNA Ligation kit were purchased from Boehringer-Mannheim. Ampicillin was obtained from International Biotechnologies INC. Culture media components were supplied by DIFCO Labs. cAMP, cAMP-dependent protein kinase (PKA), calcium-activated neutral protease (Calpain), calcium ionophore A23187, isopropyl-thiogalactoside (IPTG), and NucleiClean Nucleic Acid Rapid Isolation kit were obtained from Sigma. Ampliqaq DNA polymerase, 25 mM MgCl₂ solution, GeneAmp 10× PCR buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-Cl, pH 8.3, and 0.01% (W/V) gelatin), dATP, dTTP, dGTP, and dCTP were obtained from Perkin-Elmer. Oligonucleotides were supplied by Life Technologies. All other chemicals were analysis grade.

E. coli JM83 was used for plasmid propagation and BL21 (DE3) strain was used for protein expression (6). Epicurian coli XL1-blue supercompetent cells (Stratagene) were used for mutagenesis experiments. Plasmids used were pT7-7 and pBluescript SK⁺ (containing the complete nucleotide sequence of human endothelial cell ABP cDNA (pBS-ABP)), which was generously provided by Dr. J. H. Hartwig (1).

PCR reactions and PCR-based site-directed mutagenesis. PCR reactions were carried out using pBS-ABP as a template in a programmable heating block (GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer), initiating the reaction at 94°C for 1 min and using 30 rounds of temperature cycling (94°C for 15 s, 55°C for 15 s, and 72°C for 1.9 min (to amplify the sequence codifying for the 109-kDa peptide, fragment 1) or 72°C for 1.25 min (to amplify the sequences codifying for the 74-kDa peptide, fragment 2, and for the 48-kDa peptide, fragment 3) followed by a final 7-min step at 72°C. For PCR amplification the following oligos were used as negative-strand and positive-strand primers, respectively: LC1-Bam (5'-CGGGATCCGGT-GATCACTGTGGACTAA) and RC1-Hind (5'-GGGCCAAGCT-TCCCCAGACTCAGGGCACCACAA), for fragment 1; LC1-Bam and RC2-Cla (5'-CCATCGATTCCGCCAGCGGAGAAGCCA) for fragment 2; and LC2-Bam (5'-CGGGATCCGGGAGCCCTCCAGT-TCA) and RC1-Hind for fragment 3. Then 0.2 μM of each primer, 1 ng of template, 1× GeneAmp Buffer, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 Units of taq polymerase, and 200 μM of each dNTP were used in a final volume of 100 μl.

A missense mutation, Ser²¹⁵² → Ala (S2152A), in fragment 1 was introduced by means of the PCR-based Quikchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Fragment 1 ligated to the pT7-7 plasmid was used as the parental template. The PCR cycling parameters were: 1 cycle of 30 s at 95°C followed by 12 rounds of temperature cycling (95°C for 30 s, 50°C for 1 min, and 68°C for 1 min) and a final 5-min step at 68°C. The primers used for introducing the S2152A mutation were 5'-CGTGGGCTCTGTCAGTGGCCCAACG and 5'-CGTTGGCCACTGCAGGAGCCCGACG. Then 0.2 μM of each

primer, 5 ng of template, 1× reaction buffer, 2.5 Units of Pfu DNA polymerase, and 50 μM of each dNTP were used in a final volume of 50 μl. After amplification the mixture was treated with *DpnI* (10 units) in order to digest the *in vivo*-methylated parental and hybrid DNA. S2152A mutation and part of the DNA sequence of the fragments was confirmed by fluorescent DNA sequencing utilizing a Perkin-Elmer Genetic Analyzer 310 DNA Sequencer.

Restriction enzyme digestions, agarose gel electrophoresis, and plasmid extractions were performed as described by Sambrook *et al.* (7). DNA ligations were carried out with the Rapid DNA Ligation kit following the manufacturer's instructions. Plasmids were introduced into *E. coli* by transformation with CaCl₂ (7). PCR fragments used in subcloning were separated by 0.8% agarose gels and purified with the NucleiClean Nucleic Acid Rapid Isolation kit.

Expression of different C-terminal ABP fragments. We designed the oligonucleotides used in this study to amplify DNA sections corresponding to three different C-terminal coding regions. Oligos LC1-Bam and RC1-Hind were used to amplify a 2930-bp section corresponding to the coding region for residues 1671–2647. With the oligos LC1-Bam and RC2-Cla a 1981-bp section corresponding to the coding region for residues 1671–2331 was amplified. Finally, oligos LC2-Bam and RC1-Hind were used to amplify a 1274-bp section corresponding to the coding region for residues 2223–2647. Since the primers LC1-Bam, LC2-Bam, RC1-Hind, and RC2-Cla had single *Bam*HI, *Hind*III, and *Cla*I restriction site, respectively, followed by pair extensions 5' of the restriction site in order to allow proper cleavage, the amplified PCR products were ligated to the respective *Bam*HI, *Hind*III, and *Cla*I ends of the pT7-7 expression vector.

The ligated products were used to transform *E. coli* JM83 strain and the plasmids were characterized by digestion with *Bam*HI, *Hind*III, *Cla*I, and *Pst*I restriction endonucleases. *E. coli* BL21 (DE3) strain was then transformed with the appropriate plasmid (plasmid designation: pT7-7C1ABP (1671–2647) (for fragment 1), pT7-7C2ABP (1671–2331) (for fragment 2), and pT7-7C3ABP (2223–2647) (for fragment 3), purified by phenol/chloroform extraction, to obtain stable transformants (5, 7). For protein expression *E. coli* BL21 (DE3) cells, transformed with the appropriate plasmid, were grown at 37°C in LB medium containing 150 μg ampicillin/ml to an OD₆₀₀ = 1. The culture was induced with 1.0 mM IPTG and protein from this medium was withdrawn 3 h after induction and displayed by SDS-PAGE using 8% polyacrylamide gel. Figure 1 shows the expression of the 109-kDa fragment (Fig. 1B), the 74-kDa fragment (Fig. 1C), and the 48-kDa fragment (Fig. 1D) (together with some degradation products generated only in *E. coli* that expressed the ABP fragments) after a 3-h incubation period with 1 mM IPTG. In order to reduce the background of host proteins in some experiments rifampicin (200 μg/ml) was added 1 h after induction with IPTG.

Phosphorylation experiments. Phosphorylation assays were carried out, as previously described (5), in a buffer containing 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM cAMP, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM ATP, with or without [^γ-³²P]ATP (0.1 mCi/nmol) added and 50 μg PKA at 37°C for 2 h. Cells expressing the protein of interest were washed twice in a STE buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, and 1 mM EDTA). The cell suspension was frozen, thawed, and sonicated several times and centrifuged at 10,000g for 15 min to pellet cell debris. This was the fraction used for phosphorylation experiments. After phosphorylation protein was resolved by SDS-8% PAGE. Kodak X-OMAT film was used for autoradiograms.

In vitro proteolysis experiments. *In vitro* proteolysis experiments were carried out at 37°C in a medium containing 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM β-mercaptoethanol, and 2 mM CaCl₂. The reaction was started by the addition of protein (1.5 mg/ml) followed by the addition of 0.2 U/ml calpain. Aliquots from these media were withdrawn at the indicated times and the reaction was stopped by adding 20 μM leupeptin and 10 mM EDTA. Samples were suspended in protein sample buffer and displayed in SDS-8% PAGE.

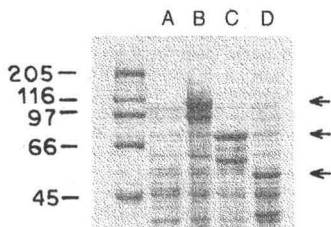


FIG. 1. Protein expression after induction with IPTG. Cell extracts were prepared and analyzed by SDS-8% PAGE using BL21(DE3) strain carrying (A) no plasmid or (B) pT7-7C1ABP (1671-2647) (fragment 1), (C) pT7-7C2ABP (1671-2331) (fragment 2), and (D) pT7-7C3ABP (2223-2647) (fragment 3) plasmids as described under Materials and Methods. Bacteria were induced with 1.0 mM IPTG and samples were withdrawn 180 min after the start of the experiment ($OD_{600} = 1$). Arrows indicate the position of the fusion proteins. Positions of the molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. Proteins were visualized by staining the gel with Coomassie blue.

Other methods. Fresh Human platelets were prepared as previously described (2, 3).

The N-terminal amino acid sequence of the recombinant peptides was confirmed by using an Applied Biosystems 491 Protein Sequencer.

Protein was determined according to the method of Lowry *et al.* (8). SDS-PAGE was conducted as described by Laemmli (9).

Analyses of nucleotide and amino acid sequence were performed using PC/GENE software (Intelli Genetics, Inc.).

RESULTS

Expression and identification of the ABP fragments.

In order to verify the expression of the ABP fragments a portion (14-17 residues) of the deduced amino acid sequences was confirmed by automated N-terminal amino acid determination. In addition, each fragment was used to immunize rabbits and generate three different anti-sera, which reacted with ABP from platelets electrophoretically transferred to nitrocellulose paper. Figure 2 shows that each of the anti-sera reacted with a protein with apparent molecular weight of 280 kDa, which corresponds to ABP.

The presence of a calpain cleavage site in fragment 1 and fragment 2 was also confirmed. Incubation of these ABP fragments with 0.2 U calpain/ml induced a time-dependent degradation of both peptides resulting in the fast accumulation of a degradation product which lost approximately 11 kDa in molecular weight as predicted from the length of the peptides obtained from the N-terminal end of the molecules to the N-terminal end of the calpain cleavage site, residues 1671 to 1762 (91 residues plus 8 residues from the polylinker region of the plasmid or ≈ 11 kDa). Longer incubation with calpain resulted in additional degradation of this product peptide (data not shown).

Phosphorylation of the ABP fragments. Previously we had identified cAMP-dependent protein kinase as the kinase that phosphorylated ABP *in situ*. Purified ABP could also be readily phosphorylated *in vitro* by PKA. The PKA phosphorylation site, which resulted in stabilization to calpain proteolysis, lies in the 90-kDa C-terminal region of the molecule which is produced upon limited cleavage with calpain in addition to the 180-kDa N-terminal actin-binding domain (2-5). From these studies, however, it was not possible to determine if one or both sites remained free in the molecule and needed to be occupied to protect ABP against proteolysis. In order to clarify this matter and to gain more insight into the nature and properties of these potential regulatory sites we decided to clone and express different C-terminal regions of the molecule in which threonine 2336 and/or serine 2152 were included or deliberately excluded. Figure 3B (lanes 3 and 4) shows that these limited regions could incorporate ^{32}P label only when serine 2152 was present (fragments 2 and 1), indicating that this residue is a suitable substrate for PKA. In addition, substitution of alanine for serine 2152 in fragment 1 (Fig. 3B, lanes 5-7), combined with the fact that fragment 3 did not incorporate ^{32}P label (Fig. 3B, lane 2), further confirmed serine 2152 as the only target for PKA phosphorylation in the C-terminal part of the molecule.

DISCUSSION

The evidence presented here indicates that three different C-terminal peptide fragments could successfully be cloned and expressed in *E. coli*. These fragments included: a calpain susceptible site and two (serine 2152 and threonine 2336) of the three cAMP-dependent protein kinase phosphorylation sites thought to be present in ABP (fragment 1), or a calpain susceptible site and only one of the PKA sites (serine

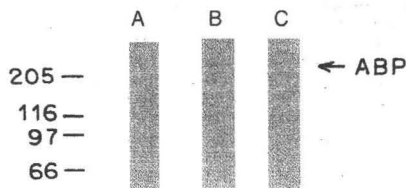


FIG. 2. Demonstration that rabbit anti-sera prepared by utilizing the three different recombinant fragments as immunogen react with ABP. Fresh human platelets were dissolved with SDS-gel sample buffer and polypeptides displayed by 8% SDS-PAGE, electrophoretically transferred to nitrocellulose paper, and immunoblotted against each anti-sera followed by peroxidase-conjugated secondary IgG. The blots were reacted sequentially with anti-sera to fragment 1 (lane A), fragment 2 (lane B), and fragment 3 (lane C). Positions of the molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

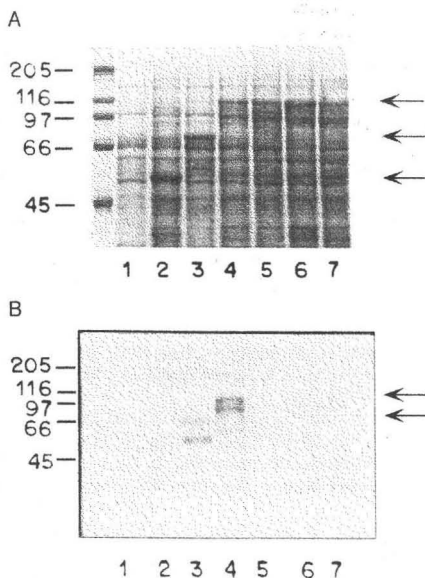


FIG. 3. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase of the ABP fragments 1, 2, and 3. (A) All samples were treated for phosphorylation in the presence of PKA as indicated under Materials and Methods. Lanes show the following samples: lane 1, PKA alone; lane 2, fragment 3; lane 3, fragment 2; lane 4, fragment 1; lanes 5-7, fragment 1 from three different colonies which carried the S2152A mutation. Protein was displayed by SDS-8% PAGE and visualized by Coomassie blue staining. Arrows indicate the position of the fragments. B shows an autoradiogram of an experiment carried out under identical conditions but in the presence of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (0.1 mCi/nmol). Arrows indicate the position of the phosphorylated fragments 1 and 2. Positions of the molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

2152) (fragment 2), or only the third potential phosphorylation site (threonine 2336) (fragment 3). Phosphorylation of these truncated peptides combined with site-directed mutagenesis analysis indicated that serine 2152 was the only residue phosphorylated by PKA in the C-terminal portion of ABP. Previous studies have indicated that this phosphorylation event may be of biological significance since it may help to modulate the interaction of ABP with other cellular elements which in turn may influence the organization of F-actin.

In platelets the actin cytoskeleton mediates a variety of essential biological functions. It provides the framework around which cell shape and structure are defined when platelets respond to diverse physiological and exogenous stimuli. Understanding the mechanisms involved in the control of actin cytoskeleton organization, therefore, is of basic importance. Previous studies have shown that phosphorylation/dephosphor-

ylation of ABP may play an important part in maintaining cytoskeleton integrity (2-5).

Indeed, ABP as isolated from platelets, is already phosphorylated with a phosphate content ranging from 18 to 40 mol Pi/mol ABP (3). In this form the protein could not be phosphorylated by PKC (although some conflicting results have emerged in this regard (10)) but reacted with PKA and retained its ability to organize F-actin into a highly cross-linked structure. In addition, phosphorylation with PKA rendered a molecule resistant to calpain degradation (2, 3). In this case the phosphorylation site appeared to be located in the 90-kDa carboxy-terminal region of the molecule which was the only fragment that incorporated ^{32}P label after phosphorylation. The actual number and location of groups that bound phosphate when protein was stabilized against calpain, however, remained to be determined.

Phosphorylation of the fragments analyzed in the present study indicates that serine 2152 may be an important element involved in the protective action of PKA upon ABP. At present, however, some questions remain regarding the nature of the regulatory mechanism. A simple competitive effect between Pi-Ser and calpain can not be easily assumed since serine 2152 is located 390 amino acids away from the cleavage site in a filamentous protein. In addition, with the present truncated peptide preparations we did not observe a significant degree of protection by PKA against calpain *in vitro* as we found with the complete protein purified from platelets (data not shown), so it is not possible to rule out that some kind of allosteric effect, probably one including the folding of large portions of the protein, may participate in the protective process.

In this regard, one interesting property of serine 2152 is that it is adjacent to a proline residue (Proline 2151). Recent evidence has indicated that proline residues provide a backbone control element in a polypeptide chain, which is guided by *cis/trans* isomerization. In addition, phosphorylation of serine- and threonine-proline motifs has been shown to be a critical regulatory event for many proteins. Protein phosphorylation at this level can specifically regulate the backbone dynamics of the Ser/Thr-Pro motifs about the peptidyl-prolyl bond (11, 12). A notable example of this type of proline-directed phosphorylation can be found in tau protein, which in patients with Alzheimer's disease is aggregated in a hyperphosphorylated state resistant to calpain proteolysis (13-15). Whether a similar molecular mechanism can participate in the regulation of ABP function remains to be established.

Another question arises as to whether the intact molecule *in vivo* can be modified by other causes. In the cell ABP-280 interacts with multiple components including plasma membrane glycoproteins (16) and inositol phospholipids (17). Phosphorylation of ABP may influence the binding of filamin to the cellular mem-

brane. In a lipidic environment the molecule would be protected from proteolysis. In this regard, a recent study utilizing a synthetic peptide, which included serine 2152, showed that phosphorylation of filamin with PKA prevented its translocation from the membrane to the cytosol as induced by H_2O_2 (18). Therefore, it is possible that filamin is not only protected from cleavage when it is phosphorylated by PKA but is also prevented from redistributing within cells. Although this mobilization process could certainly participate in the protection action afforded by PKA phosphorylation, the findings of the present study suggest that new intrinsic molecular mechanisms, which deserve further investigation, may also play a part. By systematically probing the individual steps leading to filamin phosphorylation we hope to gain more insight into the role of PKA in actin dynamics.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was in part supported by a grant from the Mexican National Council for Science and Technology (CONACYT, Grant 30558-M) to D. Jay. We thank Mr. John A. Jay for the assistance in the preparation of the manuscript, Dr. Felipe Masso for the sequencing work of the expressed peptides, and Dr. Gilberto Vargas for sequencing the DNA fragments.

REFERENCES

- Gorlin, J. B., Yamin, R., Egam, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J., and Hartwig, J. H. (1990) *J. Cell. Biol.* **111**, 1090–1105.
- Chen, M., and Stracher, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 14282–14289.
- Wu, M. P., Jay, D., and Stracher, A. (1994) *Cell. Mol. Biol. Res.* **40**, 351–357.
- Jay, D., and Stracher, A. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 764–771.
- Jay, D., and Stracher, A. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 555–558.
- Tabor, S., and Richardson, C. C. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1074–1078.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685.
- Lindberg, U., and Markey, F. (1987) in *Platelets in Biology and Pathology III* (MacIntyre, D. E., and Gordon, J. L., Eds.), pp. 220–248, Elsevier Science, Amsterdam.
- Schutzkowski, M., Bernhardt, A., Zhou, X. Z., Shen, M., Reimer, U., Rahfeld, J. U., Lu, K. P., and Fischer, G. (1998) *Biochemistry* **37**, 5566–5575.
- Gothel, S. F., and Marahiel, M. A. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 423–436.
- Gustke, N., Steiner, B., Mandelkow, E. M., Biernat, J., Meyer, H. E., Goedert, M., and Mandelkow, E. (1992) *FEBS Lett.* **307**, 199–205.
- Mandelkow, E. M., and Mandelkow, E. (1993) *Trends Biochem. Sci.* **18**, 480–483.
- Mandelkow, E. M., Schweers, O., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Trinczek, B., and Mandelkow, E. (1996) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **777**, 96–106.
- Sharma, C. P., Ezzell, R. M., and Arnaut, M. A. (1995) *J. Immunol.* **154**, 3461–3470.
- Furuhashi, K., Inagaki, M., Hatano, S., Fukami, K., and Takenawa, T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1261–1265.
- Hastie, L. E., Patton, W. F., Hechtman, H. B., and Shepro, D. (1997) *J. Cell. Physiol.* **172**, 373–381.

In situ determination of a PKA phosphorylation site in the C-terminal region of filamin

David Jay,¹ Elizabeth J. García^{1,2} and María de la Luz Ibarra¹

¹Departamento de Biomedicina Molecular Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez; ²UACP y P del CCH, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Received 1 April 2003; accepted 10 September 2003

Abstract

A C-terminal region of human endothelial actin-binding protein-280 (ABP-280 or ABP, non-muscle filamin) was subcloned and efficiently expressed in a mammalian cells system as indicated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting analysis. As predicted by the aminoacid sequence, the fragment, a 79 kD peptide (residues 1671–2361, plus 3.9 kD from an N-terminal fusion peptide included in the expression plasmid), contained the two potential cAMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylation sites (serine 2152 and threonine 2336) predicted to be present in this region of the molecule. Incubation of cells in the presence of cAMP-elevating agents enhanced ³²P uptake into the fragment. Site-directed mutagenesis analysis indicated that serine 2152 is the unique substrate in the C-terminal region of ABP for endogenously activated PKA. The functional implications of phosphorylation of this residue, which belongs to a serine-proline motif, are discussed in terms of the role of filamin in cytoskeleton reorganization. (Mol Cell Biochem 260: 49–53, 2004)

Key words: actin-binding protein-280, non-muscle filamin, calpain; cAMP-dependent protein kinase, phosphorylation, serine-proline motif, tau

Introduction

Actin-binding protein-280 molecules (ABP-280 or ABP; non-muscle filamin) are homodimers with polypeptide subunit chains of 2647 amino acids, corresponding to 280 kDa. The functional domains of each subunit include an F-actin binding region, a self-association domain, and a membrane glycoprotein binding region [1]. In platelets ABP is an important component of the cytoskeleton where it promotes rearrangement of actin filaments in response to a variety of physiological and exogenous stimuli. Previous studies indicated that a dynamic phosphorylation/dephosphorylation process may modulate the interaction of ABP with other cytoskeletal elements. Dephosphorylation of ABP by treatment with *E. coli* alkaline phosphatase resulted in the loss of its ability to crosslink F-actin into a low-speed sedimentable complex (platelet cytoskeleton) [2, 3] whereas phosphorylation of the

native protein by cAMP-dependent protein kinase (PKA) strengthens this structural framework by protecting the molecule against proteolytic cleavage by calpain. In this case the phosphorylation site lies in the 90 kD carboxy-terminal fragment, the smaller of the two fragments produced by calpain cleavage [3–7].

In this regard, the analysis of the amino acid sequence of ABP [1] revealed multiple consensus sequences specific for diverse kinases including three sites for PKA at residues 167, 2152 and 2336, whereas the calpain cleavage site has been localized to residues 1761–1762. From previous studies [5] the threonine at position 167 appears to already be phosphorylated in native ABP, whereas the remaining potential PKA sites appear to be free in the molecule and confer proteolytic stability upon becoming phosphorylated [3–7].

In an effort to identify the functionally significant phosphorylation sites in ABP we have cloned and expressed in *E.*

coli regions of the molecule which may contain such sites. Thus, we recently reported the successful cloning of the N-terminal region of the molecule which contains a PKA site probably involved in F-actin interaction [2, 5]. We also have generated *in vitro* different C-terminal fragments, which confirm serine 2152 as the only phosphorylation site in the C-terminal region of ABP [6, 7]. The finding that only ABP fragments containing serine 2152 could be phosphorylated *in vitro* by bovine heart cAMP-dependent protein kinase suggested that the same effect might be expected in intact cells treated with PKA activating agents. The present study emphasizes the use of endogenous enzymes in order to determine whether serine 2152 could be implicated as an important regulatory element when actin cytoskeleton is reorganized in response to physiological stimuli. This residue is part of a serine-proline motif, and the biological significance of its phosphorylation is discussed.

Materials and methods

E. coli TOP10 (Invitrogen) was used for plasmid propagation and BL21 (DE3) strain was used for bacterial protein expression [8]. 293FT cells were utilized for experiments involving eukaryotic protein expression. Plasmids used were pT7-7C1ABP (containing a 2930 nucleotide sequence section of human endothelial cell ABP corresponding to the codin region for residues 1671–2647), pT7-7C1ABP* (carrying a missense mutation, Ser²¹⁵²Ala (S2152A) in the 1671–2647 fragment) [7] and the mammalian expression vector pcDNA4/HisMax TOPO (Invitrogen).

PCR reactions

PCR reactions were carried out using pT7-7C1ABP or pT7-7C1ABP* as templates in a programmable heating block (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) initiating the reaction at 94°C for 1 min and using 30 rounds of temperature cycling (94°C for 15 sec, 55°C for 30 sec, and 72°C for 2.1 min) followed by a final 7 min step at 72°C. For PCR amplification the following oligos were used as negative-strand and positive-strand primers respectively: PM1LHM (5'-GTGATCACTGTGGACAC-TAAGGCGG) and PM1RHM (5'-GTCACCTGGCCCCGTTTCAGG). 0.2 μM of each primer, 1 ng of template, 1 X GeneAmp Buffer (Perkin-Elmer), 1.5 mM MgCl₂, 2.5 units of taq polymerase (Perkin-Elmer) and 200 μM of each dNTP were used in a final volume of 100 μl.

After reactions PCR products were directly ligated to the pcDNA4/HisMax TOPO mammalian expression vector. The ligated products were used to transform *E. coli* TOP10 strain and the plasmids obtained were characterized by digestion

with EcoR I and Pst I restriction endonucleases and were designated pcDNA4HM-C2 and pcDNA4HM-C2* (carrying the S2152A mutation). The missense mutation and part of the DNA sequence of the fragments was confirmed by fluorescent DNA sequencing utilizing a Perkin Elmer Genetic Analyzer 310 DNA Sequencer.

Restriction enzyme digestions, agarose gel electrophoresis and plasmid extractions were performed as described by Sambrook *et al.* [9].

Growth and maintenance conditions of the 293FT cell line

293FT cells were maintained in 75 cm² flasks containing 15 ml of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (high glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM GlutaMax, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 0.25 μg/ml amphotericin and 500 μg/ml geneticin (Gibco BRL). The flasks were incubated in a humidified (95% relative humidity), 37°C, 5% CO₂ incubator. One day before transfection, when cells were ≈ 80–90% confluent, the monolayer was detached from the flask surface with trypsin-EDTA (0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA-4Na, Gibco BRL) solution and cells were transferred to 35-mm plates.

Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used to transfect plasmids into 293FT cells. Experiments were conducted in the 35-mm plates utilizing 0.8 μg DNA per sample (8 × 10⁵ cells). Protein expression was measured three days after transfection.

Immunoprecipitation

After the phosphorylation experiments (Fig. 3) monolayers were washed once with buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.4 and 0.3 mM EDTA) and the dishes were placed on ice. 0.25 ml/35-mm plates of prechilled lysis buffer (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 2 mM EDTA) were added and samples were incubated for 30 min at 4°C. Cells were scraped from plates and homogenized with a sonic dismembrator (Fisher Scientific). The lysate was clarified (spin for 10 min at 10,000 g at 4°C) and incubated with primary Anti-Xpress antibody for 1 h. The immune complex was collected with Protein A Agarose (Bio-Rad) [10].

SDS-PAGE was conducted as described by Laemmli [11]. Kodak X-OMAT film was used for autoradiograms.

Analyses of nucleotide and amino acid sequence were performed using PC/GENE software (Intelli Genetics, Inc.). Results presented in this work represent data from typical experiments, which were highly reproducible as confirmed by multiple repetitions (n ≥ 8).

Results

Expression of the C-terminal ABP fragment

The oligonucleotides used in this study were designed to amplify a 2073-bp section corresponding to the ABP coding region for residues 1671–2361. When protein from 293FT cells was resolved by electrophoresis on an SDS-PAGE 8% gel (Fig. 1) accumulation of a new band was evident in lanes loaded with samples from cells transfected with pcDNA4HM-C2 (lane B) or with pcDNA4HM-C2* (lane C) plasmids, as compared with the lane loaded with a sample from control 293FT cells (lane A). 293FT cells transfected with pcDNA4/HisMax TOPO plasmid carrying different DNA constructs did not show this band (data not shown). As expected, the new bands (native and mutant) migrated as a 79 kD peptide (residues 1671–2361), plus 3.9 kD from the N-terminal fusion peptide included in the expression plasmid.

In order to further verify the expression of the ABP fragments, protein from transfected cells was resolved by electrophoresis and transferred to a nitrocellulose filter for blotting with anti-sera generated by immunizing rabbits [7] with a recombinant C-terminal ABP peptide expressed in *E. coli* [6].

Western blot assay (Fig. 2) showed that the anti-sera recognized the 79 kD protein fragments (lanes A and B) as well as native ABP-280 from fresh human platelets (lane C). The 79 kD fragments also reacted with Anti-Xpress antibody (Invitrogen), which detects the eight amino acid Xpress epitope, located in the N-terminal fusion peptide (additional data and results shown in Fig. 3).

Phosphorylation of the 1671–2361 fragments

Previously we had identified cAMP-dependent protein kinase as the kinase that phosphorylated ABP in platelets. Purified ABP could also be readily phosphorylated *in vitro* by bovine heart PKA. In this case the phosphorylation site appeared to be located in the 90 kD carboxy-terminal region of the molecule which was the only fragment that incorporated ^{32}P label after phosphorylation [3, 4]. Furthermore, the generation of different recombinant C-terminal peptides confirmed that *in vitro* serine 2152 was the only site that incorporated phosphate from PKA in this part of the molecule [6, 7]. Since as isolated from platelets ABP like other cytoskeletal proteins is a phosphoprotein whose phosphate content can be as high as 40 moles Pi/mole ABP [4], the possibility existed that occupation of some phosphorylation sites could alter the availability of previously recognized sites. The experiment shown in Fig. 3, however, indicates that the 1671–2361 frag-

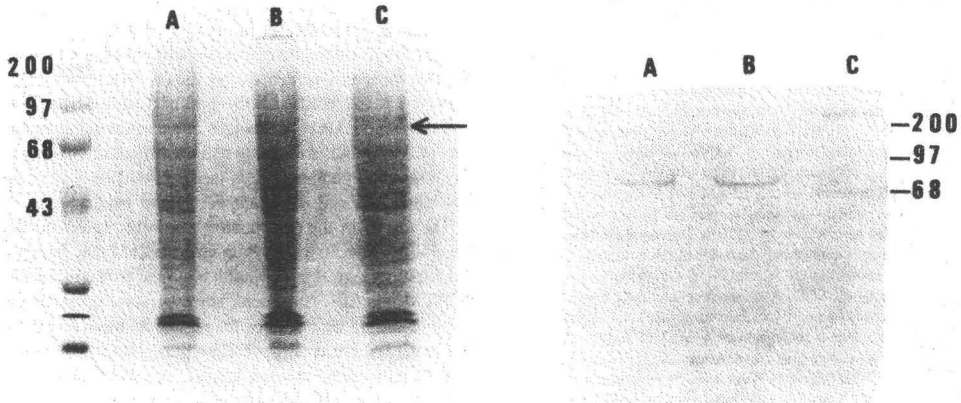


Fig. 1. Protein expression in 293FT cells. Cell extracts were prepared and analyzed by SDS-8% PAGE using 293FT cells 3 days after transfection with (A) no plasmid, (B) pcDNA4HM-C2 plasmid (1671–2361 fragment) and (C) pcDNA4HM-C2* plasmid (1671–2361 fragment carrying the S2152A mutation) as described in Materials and methods. The arrow at the right indicates the position of the fusion proteins (native and S2152A mutant). Positions of the molecular mass markers (in Kilodaltons) are indicated on the left. Proteins were visualized by staining the gel with Coomassie Blue.

Fig. 2. Demonstration that rabbit anti-sera prepared by utilizing a recombinant ABP fragment as immunogen reacted with native and mutant (S2152A) 1671–2361 fragments as well as with native ABP-280 from platelets. Three days after transfection with pcDNA4HM-C2 (A) or pcDNA4HM-C2* (B) plasmids 293FT cells as well fresh human platelets (C) were dissolved with SDS-gel sample buffer and polypeptides displayed by 8% SDS-PAGE, electrophoretically transferred to nitrocellulose paper and immunoblotted against an anti-sera prepared according to [6, 7] followed by peroxidase-conjugated secondary IgG. Positions of the molecular mass markers (in Kilodaltons) are indicated on the right.

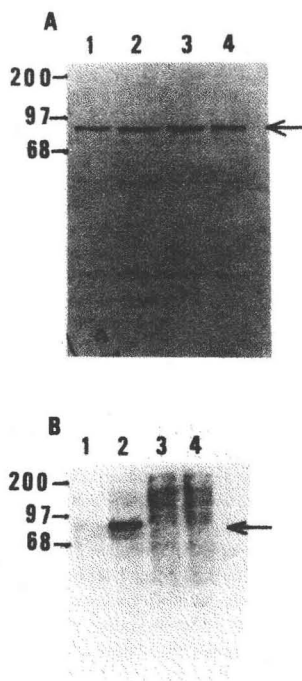


Fig. 3. *In situ* phosphorylation by cAMP-elevating agents of the native and mutant (S2152A) 1671–2361 ABP fragments. Three days after transfection with pcDNA4HM-C2 (lanes 1 and 2) or pcDNA4HM-C2* (lanes 3 and 4) plasmids 293FT cells were incubated in buffer (140 mM NaCl, 5 mM glucose, 50 mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.35% bovine serum albumin and 1 mM EDTA). [32 P]PO $_4$ was added in a ratio of 1 mCi/ml and cells were prelabeled for 1 h at 25°C. Then cells were washed twice in buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.4 and 0.3 mM EDTA) and resuspended in the same buffer plus 1 mM isobutylmethylxanthine and 10 μ M forskolin (lanes 2 and 4). All samples were incubated for 20 min. Then the recombinant fragments were immunoprecipitated as indicated in the Materials and methods section. Samples were dissolved with SDS-gel sample buffer and polypeptides displayed by 8% SDS-PAGE, electrophoretically transferred to nitrocellulose paper and immunoblotted against primary Anti-Xpress antibody followed by peroxidase-conjugated secondary IgG (A). (B) shows the autoradiogram of the western blot above. Arrows indicate the position of the phosphorylated 79 kDa fragments. Positions of the molecular mass markers (in Kilodaltons) are indicated on the left.

ment could incorporate 32 P label when expressed in 293FT cells that were treated with forskolin and isobutylmethylxanthine (similar results were obtained with COS-7 cells, data not shown). In addition, the fact that substitution of alanine for serine 2152 in this fragment totally abolished 32 P-label incorporation confirmed serine 2152 as the only target for PKA phosphorylation *in situ* in the C-terminal part of ABP.

Discussion

In platelets the actin cytoskeleton mediates a variety of essential biological functions. It provides the framework around which cell shape and structure are defined when platelets respond to diverse physiological and exogenous stimuli. Previous studies have shown that phosphorylation/dephosphorylation of ABP may play an important part in maintaining cytoskeleton integrity [3–7].

Indeed, ABP as isolated from platelets, is already phosphorylated with a phosphate content ranging from 18–40 moles Pi/mole ABP [4]. In this form the protein could not be phosphorylated by PKC (although some conflicting results have emerged in this regard [12]) but reacted with PKA and retained its ability to organize F-actin into a highly cross-linked structure. In addition, phosphorylation with PKA rendered a molecule resistant to calpain degradation [3–7]. In this case the phosphorylation site appeared to be located in the 90 kD carboxy-terminal region of the molecule which was the only fragment that incorporated 32 P label upon phosphorylation. The actual number and location of groups that bound phosphate when protein was stabilized against calpain, however, remained to be determined.

More recently, the generation of different recombinant C-terminal peptides confirmed that *in vitro* serine 2152 was the only site that incorporates phosphate from bovine heart PKA in this part of the molecule [7]. The question remained here, however, as to whether the expression of a C-terminal ABP fragment in a mammalian cell system could impair or alter the phosphorylation of previously identified sites. In particular, two consensus sequences specific for PKA phosphorylation have been identified in this part of filamin (serine 2152 and threonine 2336) and changes in the structural organization of ABP brought about by native posttranslational modification could perhaps switch the physiologically relevant phosphorylation site from one position to another.

The results of the present study, however, ruled out this possibility, indicating that in fact serine 2152 may be a relevant physiological target involved in the protective action of PKA upon ABP. At present, however, some questions remain regarding the nature of the regulatory mechanism and the structural changes that follow phosphorylation, which lead to stabilization against calpain. A simple competitive effect between Pi-Ser and calpain can not be easily assumed since serine 2152 is located 390 amino acids away from the cleavage site in what is a filamentous protein.

In this regard, one interesting property of serine 2152 is that it is adjacent to a proline residue (Proline 2151). Recent evidence has indicated that proline residues provide a backbone control element in a polypeptide chain, which is guided by cis/trans isomerization. In addition, phosphorylation of serine- and threonine-proline motifs has been shown to be a critical regulatory event for many proteins. Protein phospho-

rylation at this level can specifically regulate the backbone dynamics of the Ser/Thr-Pro motifs about the peptidyl-prolyl bond [13, 14]. A notable example of this type of proline-directed phosphorylation can be found in tau protein which, in patients with Alzheimer's disease, is aggregated in a hyperphosphorylated state resistant to calpain proteolysis [15–17]. Whether a similar molecular mechanism can participate in the regulation of ABP function remains to be established.

Interestingly, however, Fig. 3B (lanes 3 and 4) shows the appearance of additional phosphorylated bands, which were co-precipitated together with the 1671–2361 mutant fragment. Although the nature of these extra components is not clear at the present time they could represent accessory regulatory elements whose interaction with ABP is somehow altered when the integrity of the Ser-Pro motive is modified by mutation. Elucidation of their identity and clarification of the nature of their association with filamin may help in elucidating the factors involved in the control of actin/filamin dynamics.

Acknowledgements

This work was in part supported by a grant from the Mexican National Council for Science and Technology (CONACYT, Grant 40188) to D. Jay. We wish to thank Mr. John A. Jay for the assistance in the preparation of the manuscript. We also wish to express our gratitude to Mr. Tec. Histopatol. Rodrigo Velazquez for the preparation of the photographic work.

References

- Gorlin JB, Yamin R, Egam S, Stewart M, Stossel TP, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH: Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, non-muscle filamin): A molecular leaf spring. *J Cell Biol* 111: 1089–1105, 1990
- Zhuang QQ, Rosenberg S, Lawrence J, Stracher A: Role of actin binding protein phosphorylation in platelet cytoskeleton assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 118: 508–513, 1984
- Chen M, Stracher A: *In situ* phosphorylation of platelet actin-binding protein by cAMP-dependent protein kinase stabilizes it against proteolysis by calpain. *J Biol Chem* 264: 14282–14289, 1989
- Wu MP, Jay D, Stracher A: Existence of multiple phosphorylated forms of human platelet actin binding protein. *Cell Mol Biol Res* 40: 351–357, 1994
- Jay D, Stracher A: Expression in *Escherichia coli* and phosphorylation with camp-dependent protein kinase of the N-terminal region of human endothelial actin-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 764–771, 1994
- Jay D, Stracher A: Expression in *Escherichia coli*, phosphorylation with camp-dependent protein kinase and proteolysis by calpain of a 71 kD domain of human endothelial actin binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* 232: 555–558, 1997
- Jay D, Garcia EJ, Lara JE, Medina MA, Ibarra M de la L: Determination of a cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the C-terminal region of human endothelial actin-binding protein. *Arch Biochem Biophys* 377: 80–84, 2000
- Tabor S, Richardson CC: A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1074–1078, 1985
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- Harlow E, Lane D: *Antibodies*. In: *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988, pp 421–470
- Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685, 1970
- Lindberg U, Markey F: In: D.E. MacIntyre, J.L. Gordon (eds). *Platelets in Biology and Pathology III*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1987, pp 220–248
- Schutkowski M, Bernhardt A, Zhou XZ, Shen M, Reimer U, Rahfeld JU, Lu KP, Fischer G: Role of phosphorylation in determining the backbone dynamics of the serine/threonine-proline motif and Pin1 substrate recognition. *Biochemistry* 37: 5566–5575, 1998
- Gothel SF, Marahiel MA: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* 55: 423–436, 1999
- Gustke N, Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Meyer HE, Goedert M, Mandelkow E: The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett* 307: 199–205, 1992
- Mandelkow EM, Mandelkow E: Tau as a marker for Alzheimer's disease. *Trends Biochem Sci* 18: 480–483, 1993
- Mandelkow EM, Schweers O, Drewes G, Biernat J, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E: Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann NY Acad Sci* 777: 96–106, 1996