

INTERACTION OF C-FOS AND C-JUN WITH MEMBRANE PHOSPHOLIPIDS

GRACIELA A. BORIOLI

CIQUIBIC Dpto de Química Biológica, Fac. Ciencias Químicas, Univ. Nac. de Córdoba.

c-Fos and c-Jun are transcription factors that form AP-1 heterodimers to selectively regulate expression of target genes in the nucleus. c-Fos also associates to endoplasmic reticulum to activate phospholipid metabolism. Here, we aimed at determining the thermodynamic properties of c-Fos that may be related to its association to membrane. We used the monolayer technique to explore the surface activity of c-Fos as well as some aspects of its interaction with phospholipids. This simple, controlled system was used to establish the capacity of c-Fos to modulate phospholipases A₂, C and sphingomyelinase activity, and to analyze the mechanism of modulation. Complementary studies using epifluorescence- and Brewster Angle Microscopy enabled visualization of the monolayers, reinforcing our findings on molecular reorganization at the interface. Finally, we studied the surface behavior of c-Jun, its interaction with phospholipids and its association with c-Fos at the interface.

In this study we show that c-Fos is surface active, and interacts differentially with phospholipids, especially

phosphatidylinositol diphosphate. The protein undergoes reversible surface pressure dependent molecular reorganization, suggesting potential ability to mediate signal transduction at the interface. We describe c-Fos capacity to modulate phospholipases A₂, C and sphingomyelinase on dilauroylphosphatidylcholine and phosphatidylinositol diphosphate monolayers, and we show that it does so through alteration of substrate packing. Indeed, opposite effects of c-Fos on DLPC and PIP₂ surface molecular organization result in expansion/hyperpolarization and condensation/depolarization respectively.

Lastly, we ascertain c-Fos and c-Jun association concluding that it is greatly stabilized by the interface as an equimolar entity.

Our results provide a basis by which c-Fos may transduce molecular information at the membrane level.

Supported by FONCyT, CONICET, Fundación Antorchas, SeCyT-UNC and James S. McDonnell Foundation.

¿QUÉ FACTORES CONDICIONAN LA ORIENTACIÓN EN LA MEMBRANA DEL SEGMENTO GAMMA-M4 DEL RECEPTOR NICOTÍNICO DE ACETILCOLINA?

SILVIA S. ANTOLLINI

Instituto de Investigaciones Bioquímicas y Cátedra UNESCO de Biofísica y Neurobiología Molecular, Bahía Blanca, Argentina.

El receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) es una proteína transmembrana pentamérica ($\alpha_2\beta\gamma\delta$), atravesando cada subunidad 4 veces la bicapa lipídica (M1-M4). La interfase lípido-AChR es un sitio de alto interés ya que variaciones del entorno lipídico al AChR ocasionan falta de actividad de la proteína receptora, además de considerarse como el sitio potencial de acción de diversos compuestos hidrofóbicos que actuarían como inhibidores no competitivos del AChR de baja afinidad (tales como esteroides y ácidos grasos libres). La

postulación de sitios para lípidos, y/o moléculas hidrofóbicas en general, depende en gran medida de poder conocer la topología de los segmentos transmembrana del AChR, principalmente la correspondiente al segmento M4, que es el más expuesto a los lípidos. Previamente, mediante espectroscopía de fluorescencia pudimos a) caracterizar sitios específicos para fosfolípidos y colesterol en la interfase AChR-lípido de membranas ricas en AChR de *T. californica*, ambos accesibles a ácidos grasos libres (recientemente vimos que

ácidos grasos libres y esteroides compartirían los mismo sitios, localizándose éstos en el interior de la bicapa lipídica), y b) discriminar entre la topología del segmento M1 y la del segmento M4. Recientemente, trabajando con un péptido sintético correspondiente al segmento g-M4, estudiamos en más detalle su estructura secundaria y principalmente su capacidad de «adaptación/flexibilidad» a distintos entornos lipídicos generados por variación del espesor de bicapa lipídica y/o contenidos de colesterol, utilizando como señal fluorescente al único Trp transmembrana que posee el segmento g-M4. Vimos que el péptido M4 aislado presenta una considerable «flexibilidad» en respuesta a su entorno lipídico, manifiesta por cambios en el ángulo de torsión entre el esqueleto peptídico y el plano normal a la bicapa lipídica, manteniendo siempre una estructura α -hélice lineal. Pa-

ralemos realizamos estudios de simulación por dinámica molecular del péptido g-M4 modelado solo o junto con el resto de los segmentos transmembrana de la subunidad (M1-M3), con la finalidad de individualizar las interacciones relativas lípido-proteína y proteína-proteína, y las fuerzas preponderantes en cada situación para estabilizar a dicho péptido en la bicapa lipídica. En presencia del resto de los segmentos transmembrana la flexibilidad de M4 disminuye, posiblemente por prevalecer las interacciones proteína-proteína a aquellas lípido-proteína. Así, en membranas nativas, la topología del anillo peptídico del AChR más expuesto a los lípidos, es decir, aquel formado por los segmentos M4 de las cinco subunidades, estaría determinada principalmente por las interacciones con el resto de los segmentos transmembrana más que por su interacción con la interfase lipídica.

METASTABLE, PARTIALLY FOLDED INTERMEDIATES IN THE FOLDING AND MISFOLDING OF PROTEINS

SÉRGIO T. FERREIRA

*Department of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21944-590, Brazil
(Ferreira@bioqmed.ufrj.br)*

Protein folding plays a pivotal role in biological recognition and in the acquisition of biological function. By contrast, misfolding may lead to loss of function or to the gain of toxic functions, and misfolded proteins are involved in the pathogenesis of a large number of important human pathologies known as the conformational diseases. Partially folded intermediate states have been shown to be key participants in folding and have also been implicated in the misfolding routes that lead to pathologies. Therefore, detailed characterization of such intermediates is an important goal to allow a deeper understanding of folding/misfolding. However, investigation of folding intermediates is often elusive. On the one hand, the transient, short-lived nature of the intermediates makes their detection challenging in kinetic experiments. On the other hand, they often correspond to metastable conform-

ers that are not significantly populated in equilibrium experiments. We have been using a combination of hydrostatic pressure, low/high temperatures and chemical denaturants to enable the detection and characterization of partially (un)folded intermediates. Here, we present recent results obtained (i) in the investigation of the folding energetics of small, *de novo* designed three- and four-helix bundles, and (ii) in the stabilization of partially folded states of the prion protein, involved in spongiform encephalopathies, and of human lysozyme variants involved in systemic amyloidosis.

Supported by Howard Hughes Medical Institute (USA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro and Financiadora de Estudos e Projetos (Brazil).