UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Sandra Mara Naressi Scapin



"ANÁLISES ESTRUTURAIS DE GTPases DA FAMÍLIA RAB E MECANISMO DE REGULAÇÃO DE MAFB PELA PROTEÍNA TIPRL"

Este exemplar corresponde à redação fina	ıl
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
SANDRA MARA NARRESSI SCAPIN	-
philson J (- tanching	.0
e aprovada pela Comissão Julgadora.	

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular na área de Genética Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin Co-Orientadora: Profa. Dra. Beatriz Gomes Guimarães

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Sca69a	Scapin, Sandra Mara Naressi Análises estruturais de GTPases da família rab e mecanismo de regulação de MafB pela proteína TIPRL / José Sérgio de Macedo Soares. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.
	Orientadores: Nilson Ivo Tonin Zanchin, Beatriz Gomes Guimarães. Tese (doutorado) — Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.
	 Proteínas rab de ligação a GTP. 2. Proteína TIP41. Fator de transcrição MafB. 4. Cristalografia de proteínas. 5. Regulação transcricional. I. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. II. Guimarães, Beatriz Gomes. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
	(rcdt/ib)

Título em inglês: Structural analyses of rab family GTPases and mechanism of MafB regulation by the protein TIPRL.

Palavras-chave em inglês: Rab GTP-Binding proteins; TIP41 protein; MafB transcription factor; Protein crystallography; Transcriptional regulation.

Área de concentração: Genética Animal e Evolução.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Nilson Ivo Tonin Zanchin, Jörg Kobarg, José Andrés Yunes, Aline Maria da Silva, Hugo Aguire Armelin.

Data da defesa: 17/05/2007.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 17 de maio de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin (Orientador)

Prof. Dr. Jörg Kobarg

Prof. Dr. José Andrés Yunes

Profa. Dra. Aline Maria da Silva

Prof. Dr. Hugo Aguirre Armelin

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Prof. Dr. Michel Georges Albert Vincentz

Profa. Dra. Aparecida Sadae Tanaka

Assinatura



Assinatura Assinatura

Assinatura

Assinatura

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Terezinha e Paulo, meus maiores exemplos de vida e também principais incentivadores, por todo seu amor e toda uma vida dedicada a prover as melhores condições de crescimento pessoal e profissional às filhas, mesmo tendo que nos ver partir.

Ao Nilson, pela orientação e pelo muito que aprendi durante todos esses anos, mas principalmente por acreditar no meu futuro profissional.

À Beatriz Guimarães, minha co-orientadora, pelos valiosos ensinamentos e por, graças a sua extrema competência, ter tornado tão mais fácil o aprendizado na área de cristalografia de proteínas.

Ao Fábio Lima, pelo enorme carinho, compreensão e apoio em todos os momentos, que tanto me fortaleceram.

À minha irmã Paula, e às "irmãs de consideração" Ilka, Elke e Érika, pela eterna amizade e carinho.

A todos os meus familiares, e também à Sueko, pela energia positiva e pela torcida de sempre.

Às minhas amigas Flávia Carneiro, Flávia Nery, Daniela Ierardi, Kelly e Giselle por todos os momentos felizes e inesquecíveis que passamos juntas e que me encorajaram a continuar seguindo em frente.

À amiga e colaboradora Juliana Smetana, pela competência e dedicação admiráveis, e pela excelente oportunidade de desenvolvermos um trabalho juntas.

Às demais queridas amigas do lab, Thais, Pat, Bia, Dani, Celisa e Liliane, pela intensa troca de experiências e também pelas boas risadas.

Aos colegas Cédric, Tiago, Carlos, Júlio, Daniel Trindade, Alexandre Quaresma, Rosi, Tininha e Juliana Oliveira por serem sempre prestativos e pelo ótimo convívio.

Um agradecimento muito especial à Tereza e à Adriana, que muito me ensinaram e que sempre demonstraram uma grande disposição em contribuir para a parte experimental do trabalho.

Aos funcionários Andréia Meza e Fábio Schaberle, técnicos dos laboratórios de cristalografia e espectroscopia, por todo o apoio e atenção prestados.

À Zildene, por seu excelente trabalho no sequenciamento de DNA, e também à Givanil, funcionária da esterilização de materiais, por estar sempre pronta a ajudar.

A todos os demais pesquisadores, funcionários e alunos do LNLS por nossa tranqüila convivência e, em especial, ao Prof. Javier Medrano, pelo auxílio na parte de cristalografia.

Aos Profs. Drs. Jörg Kobarg e Andrés Yunes pela grande contribuição através de sugestões para a conclusão desta tese, tanto na banca prévia quanto na avaliação final.

Às Profas. Dras. Aline Maria da Silva e Aparecida Sadae Tanaka, e aos Profs. Drs. Hugo Aguirre Armelin, Hernandes Faustino de Carvalho e Michel Georges Albert Vincentz pela disposição em participar da avaliação deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UNICAMP, pela admirável competência do seu corpo docente no ensino e na pesquisa.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao LNLS pelo fornecimento de uma excelente infra-estrutura para a pesquisa.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIAÇÕES	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1-INTRODUÇÃO	1
1.1-Compartimentalização celular e a família Rab de GTPases	1
1.1.1-A subfamília Rab11	5
1.1.2-A GTPase Rab21	6
1.1.3-Aspectos estruturais de GTPases Rab e mecanismos de especificidade	7
1.2-Resposta celular a nutrientes e a função de proteínas da via de sinalização sensível à rapamicina.	9
1.3-O fator de transcrição MafB	11
2-OBJETIVOS	15
3-RESULTADOS	16
3.1-Artigo I	17
3.2-Resultados da cristalização da Rab21 e ensaios de termo-estabilidade	27
3.3-Artigo II	42
4-DISCUSSÃO	55
4.1-Análise da estrutura cristalográfica da GTPase Rab11b humana	55
4.1.1-Alterações estruturais durante o processo de ativação	55
4.1.2-Comparação estrutural entre as isoformas Rab11b e Rab11a	55

4.1.2.1-Análise estrutural das GTPases Rab11b e Rab11a inativas	56
4.1.2.2-Análise estrutural das GTPases Rab11b e Rab11a ativas	59
4.2-Estudos estruturais e funcionais da GTPase Rab21 humana	61
4.3-Termo-estabilidade e formação de estruturas-β por GTPases Rab11	64
4.4-Análise da interação entre as proteínas TIPRL e MafB	66
5-CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	69
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
DECLARAÇÃO (Lei de Biossegurança)	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Representação do cliclo GTPase de proteínas da família Rab	2
Figura 1.2: Representação de diferentes vias de transporte intracelular envolvendo diversas Rabs	3
Figura 1.3: Representação de um modelo estrutural de GTPases da família Rab	8
Figura 1.4: Modelo proposto para a função da proteína TIP41 na via de sinalização da quinase TOR, em levedura	9
Figura 1.5: Esquema representativo dos motivos estruturais presentes nas proteínas da família Maf	12
Figura 4.1: Ensaio de gel-filtração da proteína Rab11b	58
Figura 4.2: Ensaio comparativo de hidrólise de GTP <i>in vitro</i> das proteínas Rab11a e Rab11b	60

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- **4E-BP** Proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein*)
- **AP-1** Proteína ativadora 1 (*Activator protein 1*)
- Arf Fator de ribosilação de ADP (*ADP ribosylation factor*)
- **bZIP** Domínio protéico contendo uma região básica e um zíper de leucinas (*basic-leucine zipper domain*)
- **CD** Dicroísmo circular (circular dichroism)
- **CRE** Elemento de resposta a AMP cíclico (*cyclic AMP responsive element*)
- **CREB/ATF** Proteína ligante do elemento de resposta a AMP cíclico/ Fator de transcrição dependente de AMP cíclico (*cAMP response element-binding protein/ cAMP-dependent transcription factor*)
- **DTT** Ditiotreitol
- **EDTA** Ácido etilenodiaminotetracético
- **EGFP** Proteína de florescência verde intensa (*enhanced green fluorescent protein*)
- **EHR** Região de homologia estendida (*extended homology region*)
- **ERK** Quinase regulada por sinais extracelulares (*extracellular signal-regulated kinase*)
- **FIP** Família composta por proteínas que interagem com Rab11 (*family of Rab11 interacting proteins*)
- **GAP** Proteína ativadora de GTPase (*GTPase activating protein*)
- **GDF** Fator que desloca GDI (*GDI displacement factor*)
- **GDI** Inibidor da dissociação de GDP (*GDP dissociation inhibitor*)
- **GEF** Fator de troca de nucleotídeos de guanina (*guanine nucleotide exchange factor*)

GNFC	Chaperones livres de nucleotídeo de guanina (guanine nucleotide-free chaperones)		
GppNHp	Guanosina-5'-(β,γ)-imidotrifosfato		
GST	Glutationa S-transferase		
GTPases	Guanosina trifosfatases (guanosine triphosphatases)		
IPTG	Isopropil-β-D-galactopiranosídeo		
LB	Meio de cultura de bactérias "Luria Bertani"		
Maf	Oncogene causador do fibrosarcoma musculoaponeurótico em aves (<i>musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene</i>)		
МАРК	Quinases ativadas por mitógenos (mitogen-activated protein kinase)		
MARE	Elemento de reconhecimento por Maf (Maf-recognition element)		
MEM	Meio essencial mínimo para cultura de células de mamíferos (Minimum essential medium)		
mRFP	Proteína monomérica de fluorescência vermelha (monomeric red fluorescent protein)		
NRL	Maf específica da retina neural (neural retina-specific leucine zipper protein)		
OD ₆₀₀	Densidade óptica a 600 nanômetros		
PCR	Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)		
PDB	Banco de dados de estrutura de proteínas (Protein Data Bank)		
PEG	Polietilenoglicol		
PSIPRED	Servidor de predição de estrutura secundária de proteínas (Protein Structure Prediction Server)		
Rab	Proteínas semelhantes à Ras, encontradas em cérebro (Ras-like proteins in brain)		
RabGGTase	Proteína que transfere grupos geranilgeranil para a Rab (<i>Rab Geranylgeranyl-transferase</i>)		

Ran	Proteína nuclear semelhante à Ras (Ras-like nuclear)		
Ras	Proteína relacionada ao Sarcoma de Ras (Ras Sarcoma)		
RBD	Domínio protéico de ligação à subfamília Rab11 (Rab11/25 binding domain)		
RCP	Proteína de associação a Rab (Rab coupling protein)		
REP	Proteína que acompanha a Rab (Rab escort protein)		
Rho	Homóloga de Ras (Ras homologous)		
Rip11	Proteína de interação a Rab11 (Rab11 interacting protein)		
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de duodecil-sulfato de sódio (<i>sodium duodecyl-sulphate poliacrilamide gel electrophoresis</i>)		
SD-WHL	Meio mínimo para o crescimento de levedura, que não contém triptofano, histidina e leucina (<i>Synthetic Defined medium-TRP-HIS-LEU</i>)		
SD-WL	Meio mínimo para o crescimento de levedura, que não contém triptofano e leucina (<i>Synthetic Defined medium-TRP-LEU</i>)		
Tap42	Proteína associada à fosfatase do tipo 2A, de 42 kDa (<i>Type 2A phophatase-associated protein of 42 kDa</i>)		
ТСТР	Proteína associada a tumor, regulada em nível de tradução (translationally controlled tumor-associated protein)		
ThT	Tioflavina T		
Tip41	Proteína de interação com Tap42, de 41 kDa (<i>Tap42-interacting protein of 41 kDa</i>)		
TIPRL	Proteína semelhante à Tip41, reguladora da via de sinalização da TOR (<i>Tip41, TOR signalling pathway regulator-like</i>)		
Tm	Temperatura média de transição		
TOR	Quinase sensível a rapamicina (target of rapamycin)		
TRE	Elemento de resposta a TPA (phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate (TPA) responsive element)		
X-Gal	5-bromo-4-cloro-β-D-galactopiranosídeo		

RESUMO

As GTPases da família Rab regulam o transporte intracelular de vesículas em eucariotos. Cada Rab atua em uma via de transporte específica e seu mecanismo de ação se dá através da realização de um ciclo de ligação e hidrólise de GTP. Neste trabalho, foi determinada a estrutura cristalográfica das formas inativa (ligada a GDP) e ativa (ligada a GppNHp) da GTPase Rab11b, um membro da subfamília Rab11 que está envolvida na reciclagem de proteínas dos endossomos para a membrana plasmática, no tráfego de vesículas da rede trans-Golgi para a membrana plasmática e na fagocitose. Os resultados foram confrontados com os dados estruturais da Rab11a descritos anteriormente. A Rab11b inativa cristalizou como um monômero, o que gera conflitos a respeito da formação de dímeros funcionais pela Rab11a. A Rab11b e a Rab11a ativas divergiram em relação à posição e à interação da serina 20, que é importante na hidrólise de GTP, mas apresentaram taxas hidrolíticas semelhantes in vitro. Visando uma investigação mais ampla da família Rab, a GTPase Rab21 também foi cristalizada, mas os cristais difrataram até 2.90 Å de resolução. Ensaios de desnaturação térmica revelaram que a Rab21 é estruturalmente mais instável do que a Rab11, talvez pela presença de cisteínas que estão susceptíveis à oxidação, contribuindo para a agregação e precipitação da proteína. A Rab11 é bastante estável, e possivelmente forma estruturas do tipo beta-amilóide em altas temperaturas. Este trabalho envolveu também o estudo funcional da interação entre a proteína TIP41 humana (TIPRL) e o fator de transcrição MafB. A TIPRL é uma proteína conservada que foi identificada como uma ativadora de MAP quinases enquanto sua homóloga em levedura foi caracterizada como um antagonista da via de sinalização da quinase TOR que regula o crescimento celular. A MafB está envolvida no controle transcricional em diversos processos de desenvolvimento, mas seus reguladores ainda não estão bem estabelecidos. A interação direta entre a TIPRL e a MafB inteira, ou seu domínio bZIP isolado, foi confirmada através de ensaios de ligação in vitro. As proteínas co-localizaram no núcleo de células HEK293 e nossos resultados preliminares mostram que a TIPRL inibe a atividade transcricional da MafB in vivo, embora apenas interfira na ligação in vitro do domínio bZIP da MafB ao seu DNA-alvo mediante a estabilização do complexo TIPRL-bZIP. A TIPRL pode, portanto, constituir um novo regulador da atividade de MafB.

ABSTRACT

GTPases of the Rab family are responsible for the intracellular transport of vesicles. Each family member acts on a specific transport pathway and their function is regulated by GTP binding and hydrolysis, cycling between inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) forms. In this work, we describe the crystal structure of inactive and active forms of the GTPase Rab11b, a member of the Rab11 subfamily which is involved in recycling of proteins from endosomes to the plasma membrane, in polarized transport in epithelial cells, in the transport of molecules of the trans-Golgi network to the plasma membrane and in phagocytosis. The Rab11b structure showed several differences from the Rab11a isoform previously described. Inactive Rab11b crystallized as a monomer, contradicting the hypothesis about functional dimers formed by Rab11a. Active Rab11b differ from Rab11a relative to the position of the serine 20 sidechain, which is involved in GTP hydrolysis, although both GTPases show similar GTP hydrolysis rates in vitro. In order to obtain structural information on Rab GTPases, Rab21 was also crystallized, but the crystals diffracted to a relatively low resolution (2.90 Å). Rab21 is a cysteine rich protein, showing a higher instability relative to Rab11b. Thermal unfolding followed by circular dicroism confirmed this hypothesis. Both Rab11b and Rab11a show a relatively high thermal stability and circular dicroism analysis indicate that they undergo conversion to structures rich in *beta*-strands upon thermal denaturation. This work includes also studies on the function of TIPRL in regard to its interaction with the transcription factor MafB. TIPRL is a conserved human protein identified as an activator of MAP kinases whereas its yeast counterpart Tip41 functions as an antagonist of the TOR kinase pathway. MafB is a large member of the Maf family of bZIP transcription factors controlling developmental processes in vertebrates. Regulation of MafB is critical, for example, during erythroid differentiation. A direct interaction between TIPRL and full length MafB and the bZIP domain of MafB was confirmed by *in vitro* interaction assays. TIPRL is localized throughout the whole cell and overlaps with MafB in the nucleus of HEK293 cells. Preliminary assays showed that TIPRL inhibits transcriptional activation mediated by MafB in HEK293 cells, although MafB shows a higher binding affinity to its target DNA relative to TIPRL in vitro. This evidence indicates that TIPRL may control MafB activity in vivo.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Compartimentalização celular e a família Rab de GTPases

A superfamília do oncogene *ras* é composta por proteínas de baixo peso molecular (20-29 kDa), ligantes de GTP, envolvidas na regulação de uma diversidade de respostas biológicas. A classificação original dos membros deste grupo propõe sua divisão em 5 famílias: Ras, que atua no crescimento celular; Rho, que controla a arquitetura do citoesqueleto dentre outras funções; Rab e Arf, ambas envolvidas no tráfego intracelular de vesículas; e Ran, que atua na regulação do transporte núcleo-citoplasmático (Wennerberg et al., 2005).

A família Rab (Ras-like proteins in brain) é o maior grupo da superfamília do ras e exerce um papel fundamental para a manutenção da complexa compartimentalização das células eucarióticas, através da regulação de mecanismos de transporte específicos entre as diversas organelas, garantindo sua identidade e integridade estrutural. O transporte intracelular de moléculas regulado pelas Rabs compreende quatro principais etapas. A primeira delas consiste na correta seleção e internalização das moléculas a serem transportadas em vesículas formadas a partir da membrana do compartimento de origem. A seguir, as vesículas são direcionadas para o compartimento de destino, através da interação com proteínas motoras que as conduzem através de microtúbulos ou filamentos de actina. Em uma próxima etapa, as vesículas são ancoradas à membrana do compartimento receptor e, finalmente, as membranas se fundem completando todo o processo. Diversos trabalhos mostram que as GTPases da família Rab regulam cada uma dessas etapas do tráfego de vesículas (Zerial e McBride, 2001; Pfeffer, 2001; Grosshans, 2006). Esta função está estreitamente relacionada à capacidade das Rabs realizarem um ciclo de ligação e hidrólise de GTP, que está acoplado a eventos de inserção e extração da membrana. A capacidade de associação reversível a membranas das Rabs é possível graças a modificações pós-traducionais, através da adição de grupamentos geranilgeranil altamente hidrofóbicos em motivos de cisteína (C) presentes na extremidade C-terminal dessas GTPases (CXXX, CC, CXC, CCXX ou CCXXX, onde X representa um aminoácido qualquer) (Pereira-Leal et al., 2001; Pylypenko et al., 2003). Através do ciclo GTPase, ilustrado na Figura 1.1, as Rabs transitam entre um estado ativo, de ligação ao GTP e à membrana, onde ocorre o

reconhecimento e a interação específica com moléculas efetoras, e um estado inativo, de ligação ao GDP e solubilização no citoplasma.



Figura 1.1: Representação do ciclo GTPase de proteínas da família Rab. Proteínas Rab-GDP recém-sintetizadas são reconhecidas por proteínas REP (Rab Escort Protein) (1) que medeiam sua interação com a RabGGTase (Rab Geranylgeranyl-transferase) (2). A RabGGTase é responsável pela modificação pós-traducional em cisteínas presentes na extremidade C-terminal das Rabs, através da adição de grupos hidrofóbicos. Este processo torna as Rabs aptas a se associarem à membrana-alvo de origem (3), ainda com o auxílio da REP que, após este processo, se dissocia e retorna ao citoplasma (4). Na membrana de origem a Rab é ativada por um GEF (guanine nucleotide exchange factor), que realiza a troca de GDP por GTP (5-7). Postula-se que nesta etapa pode ocorrer um estado de transição, em que a Rab livre de nucleotídeo seria estabilizada na membrana por chaperones GNFC (guanine nucleotide-free chaperones) como a proteína TCTP (translationally controlled tumor-associated protein), embora ainda exista pouca informação a respeito do papel funcional desses complexos Rab/chaperones. Depois de ativada, a Rab-GTP interage com moléculas efetoras (E1, E2, E3) que vão, em conjunto, promover a formação, o direcionamento, a ancoragem e a fusão da vesícula de transporte (ECV) à membrana receptora (8,9). Ocorre, a seguir, a hidrólise de GTP, com o auxílio de GAPs (GTPase activating proteins), levando à dissociação dos efetores e à inativação da GTPase Rab (10) que é, então, removida da membrana e transportada de volta ao sítio de origem, complexada ao GDI (GDP dissociation inhibitor) (11,12). A reinserção da Rab-GDP à membrana é facilitada por um GDF (GDI displacement factor) e o GDI livre retorna ao citoplasma para novos ciclos de transporte (13,14). Figura extraída de Stein et al., 2003.

Até o momento, 11 proteínas da família Rab foram identificadas em levedura e mais de 60 já foram descritas em humanos, sendo que a maioria é ubiquamente expressa (Pereira-Leal e Seabra, 2001; Seabra et al., 2002). Além disso, GTPases Rab já foram encontradas em todos os

organismos eucarióticos investigados (Bock et al., 2001). Este grande número e ampla distribuição ilustram bem a importância funcional deste grupo de proteínas. Cada Rab apresenta uma localização celular distinta e relacionada à etapa de transporte em que está envolvida (Seabra e Wasmeier, 2004; Pfeffer e Aivazian, 2004) (Fig. 1.2). Por exemplo, as proteínas Rab1 e Rab2 são perinucleares e atuam na translocação de vesículas do retículo endoplasmático para o Golgi (Chavrier et al., 1990). Já a Rab6 está presente no Golgi e está relacionada ao transporte vesicular através desta organela (Martinez et al., 1994), enquanto a Rab8 direciona as vesículas do Golgi para a membrana plasmática (Peranen et al., 1996).



Figura 1.2: Representação de diferentes vias de transporte intracelular (setas) envolvendo diversas Rabs. Na via biossintética, proteínas são transportadas do retículo endoplasmático (ER) ao complexo de Golgi e, então, para a superfície da célula. Na rede trans-Golgi (TGN), moléculas podem ser transportadas através de vesículas de secreção constitutiva (CV) ou de secreção regulada (RV). Células especializadas podem apresentar melanossomos (M), que geram a pigmentação. Na endocitose, o material captado do meio extracelular é inicialmente conduzido aos endossomos primários (EE) e pode ser devolvido para a superfície, diretamente ou através de um endossomo de reciclagem (RE), ou então transportado a um endossomo secundário (LE) e, a seguir, ao lisossomo. A localização de GTPases Rab que participam desses vários processos está indicada. Figura extraída de Stenmark e Olkkonen, 2001.

As Rabs apresentam um alto grau de similaridade, principalmente na região ligante de nucleotídeo, sendo que a maior parte das diferenças reside no C-terminal, o que tem sido apontado como o principal determinante da localização celular diferenciada dessas GTPases (Chavrier et al., 1991), embora outras regiões também pareçam ser importantes para este processo de endereçamento (Ali et al., 2004). Além disso, fatores GEF e proteínas efetoras também podem contribuir para a localização específica de GTPases Rab. Isto porque uma Rab-

GDP associada à membrana está constantemente sujeita à extração por um fator GDI até que seja ativada. Assim, o reconhecimento imediato por um fator GEF é fundamental para sua estabilização na membrana. A Rab-GTP pode, a seguir, recrutar efetores que vão garantir ainda mais sua ligação estável à membrana, simultaneamente limitando sua difusão e bloqueando sua inativação por um fator GAP (Grosshans et al., 2006).

Existem doenças genéticas envolvendo GTPases da família Rab e seus reguladores, o que comprova a importância funcional dessas proteínas. Por exemplo, a Síndrome de Griscelli é uma doença autossômica recessiva associada a albinismo parcial e deficiências imunológicas e que é causada por mutações *missense* no gene da Rab27a. Esta GTPase regula o movimento de melanossomos para a periferia celular dos melanócitos e também regula a secreção de grânulos líticos em linfócitos T citotóxicos, daí as manifestações observadas nesses pacientes (Menasche et al., 2000; Hume et al., 2001; Stinchcombe et al., 2001). Um subgrupo de pacientes com retardo mental associado ao cromossomo X apresenta mutações no gene para a isoforma α do GDI. Esta isoforma é particularmente abundante no cérebro e acredita-se que sua deficiência compromete a reciclagem de uma ou mais GTPases Rab nas vesículas sinápticas, promovendo anormalidades na neurotransmissão (D'Adamo et al., 1998).

Alguns processos celulares são compostos pela integração de diferentes vias de transporte interdependentes. No caso, por exemplo, de processos de exocitose, existe uma conexão do transporte de vesículas de secreção através do Golgi com o posterior direcionamento dessas vesículas do Golgi para a membrana plasmática. Como cada uma dessas vias é regulada por diferentes Rabs, é necessário haver um mecanismo de controle integrado, que permita que a conclusão da primeira etapa desencadeie a etapa seguinte do processo. Recentemente foi proposto um mecanismo denominado "Cascatas Rab", através do qual seria possível essa regulação (Wang e Ferro-Novick, 2002, Rink et al., 2005, Eitzen et al., 2000, Grosshans, et al., 2006, Markgraf et al., 2007). Através desse mecanismo, um efetor da primeira etapa do transporte poderia atuar como GEF da etapa seguinte. No processo de exocitose em levedura, por exemplo, foi verificado que o fator Sec2p, que é um efetor das Rabs Ypt31p e Ypt32p que regulam o tráfego de vesículas de secreção através do Golgi (Jedd et al., 1997, Benli et al., 1996, Ortiz et al., 2002), é também o GEF responsável pela ativação da Rab Sec4p do processo seguinte de transporte dessas vesículas para a membrana plasmática (Salminen e Novick, 1987, Walch-Solimena et al., 1997). Em mamíferos, o processo de cascatas Rab foi proposto para

explicar a conexão entre as vias iniciais e tardias da endocitose, reguladas respectivamente pelas Rabs 5 e 7 (Rink et al., 2005), o que indica que esse é um processo conservado e que confere especificidade e continuidade às vias de transporte intracelulares.

1.1.1 - A subfamília Rab11

Muitas das várias proteínas da família Rab já descritas em mamíferos parecem ser produto de duplicações gênicas, dado que diversos grupos de proteínas bastante relacionadas, ou "subfamílias", cujos membros compartilham 75% a 95% de similaridade, já foram delineados dentro desta família (Bock et al., 2001). A subfamília Rab11, composta pelas GTPases Rab11a, Rab11b e Rab25, apresenta localização sub-apical e está envolvida na reciclagem de proteínas dos endossomos para a membrana plasmática (Ullrich et al., 1996), no transporte polarizado em células epiteliais (Wang et al., 2000), assim como no tráfego de moléculas da rede trans-Golgi para a membrana plasmática (Chen et al., 1998) e na fagocitose (Cox et al., 2000). As proteínas Rab11a e Rab11b são ubiquamente expressas, enquanto a Rab25 está presente exclusivamente em células epiteliais (Goldenring et al., 2001) e parece atuar na regulação de processos de transporte específicos deste tipo celular. Já as diferenças funcionais entre a Rab11a e a Rab11b ainda não foram esclarecidas. Foi identificado um grupo de proteínas que interagem com GTPases Rab11, denominadas FIPs (Family of Rab11 Interacting Proteins), que compartilham um domínio RBD (Rab11/25 binding domain) conservado na região C-terminal (Meyers e Prekeris, 2002). Com base na presença de domínios estruturais adicionais, as FIPs foram classificadas em três grupos (Prekeris, 2003): Classe I, composta pelas proteínas Rip11, FIP2 e RCP que contêm um domínio C2, Classe II, que inclui proteínas contendo dois motivos EFhand e uma região rica em prolinas (FIP3/eferina, FIP4), e Classe III, que não apresenta homologia a nenhum domínio conhecido, do qual faz parte a FIP1. Apesar da identificação das FIPs, ainda não foi determinado seu papel funcional na regulação do tráfego intracelular de vesículas. Dado que a maioria das células de mamífero expressa muitas proteínas FIP, um possível papel seria a formação de complexos mutuamente exclusivos com a Rab11 e seu direcionamento para diversas vias de transporte (Meyers e Prekeris, 2002). Além disso, devido a identificação de diversas proteínas capazes de interagir com as FIPs (Prekeris, 2003; Cullis et al., 2002; Hickson et al., 2003; Lapierre et al., 2001; Lindsay et al., 2002, Shin et al., 1999) pode

ser que as FIPs atuem como adaptadores, regulando o recrutamento de efetores adicionais para as rotas de transporte em que a Rab11 atua (Peden et al., 2004). Junutula et al., 2004, analisaram por calorimetria possíveis diferenças na capacidade de interação das FIPs com as isoformas Rab11a e Rab11b. No entanto, os resultados demonstraram que as FIPs analisadas interagiram igualmente bem com as duas isoformas, sugerindo que a Rab11a e a Rab11b devem mediar funções celulares redundantes. Posto que estas GTPases estão presentes nas mesmas células e interagem igualmente com as mesmas proteínas, ainda há que se esclarecer se existe algum outro aspecto em que estas duas isoformas possam diferir ou qual a importância biológica da presença simultânea de duas proteínas tão semelhantes estrutural e funcionalmente.

1.1.2 - A GTPase Rab21

A GTPase Rab21, um membro ainda pouco estudado da família Rab, foi originalmente clonada e seqüenciada a partir de uma biblioteca de células da linhagem MDCK II (*Madin-Darby canine kidney cells*) (Zerial e Huber, 1995) e, posteriormente, a partir de células humanas de epitélio intestinal da linhagem CaCo-2 (*colon carcinoma-2*) (Opdam et al., 2000). A Rab21 é ubiquamente expressa e sua localização nas células Caco-2 mostrou-se dependente da polarização celular, já que a proteína foi detectada no retículo endoplasmático de células não-polarizadas e em vesículas apicais de células polarizadas (Opdam et al., 2000). Simpson et al., 2004, em um primeiro estudo funcional da Rab21, demonstraram seu envolvimento nas etapas iniciais da endocitose e que a expressão de formas mutadas afetam a morfologia e a função dos endossomos.

É interessante notar que a Rab21 apresenta cinco resíduos de cisteína ao longo de sua seqüência primária, além das duas cisteínas preniladas do C-terminal que caracterizam a família Rab, uma particularidade dentro do grupo já que nenhuma outra Rab é tão rica em cisteínas. Este fato pode gerar diferenças em relação à estabilidade da Rab21 e das demais Rabs e estudos nesse sentido podem contribuir para elucidar diferentes aspectos estruturais em uma família de proteínas altamente similares.

1.1.3 - Aspectos estruturais de GTPases Rab e mecanismos de especificidade

Algumas GTPases da família Rab já tiveram suas estruturas resolvidas e estes estudos estão cada vez mais contribuindo para um melhor entendimento do mecanismo de ação dessas GTPases (Ostermeier e Brunger, 1999, Chattopadhyay et al., 2000, Esters et al., 2000, Stroupe e Brunger, 2000, Rak et al., 2004, Pasqualato et al., 2004, Eathiraj et al., 2005). Através desses estudos foi demonstrado que as proteínas Rab apresentam, de modo geral, uma estrutura que é comum a todas as GTPases da superfamília *Ras* (Fig. 1.3). Esta consiste de 6 folhas- β (5 paralelas e 1 antiparalela) circundadas por 5 α -hélices. Os aminoácidos formadores dos sítios para ligação do nucleotídeo de guanina, do Mg⁺² e para hidrólise de GTP, estão localizados em cinco *loops* que conectam as α -hélices e folhas- β e são altamente conservados em toda a superfamília *ras*. A análise estrutural dessas proteínas permitiu também delimitar duas regiões conservadas denominadas *Switch I* e *Switch II* que sofrem importantes alterações conformacionais induzidas pela ligação do nucleotídeo de guanina reguladoras, como GEFs e GAPs, e com efetores.

Pereira-Leal e Seabra, 2000, realizaram uma ampla análise comparativa das seqüências de diversas GTPases Rab e, com base nos resultados obtidos e na informação disponível a partir de estudos cristalográficos, definiram cinco regiões distintas (denominadas RabF), que estão presentes dentro ou próximas às regiões *Switch I* e *II*, e que são características de GTPases da família Rab. Também definiram outras 4 regiões, denominadas RabSF, que são compartilhadas por membros de uma mesma subfamília Rab, porém distintas entre diferentes subfamílias. Estes autores propuseram um modelo onde moléculas efetoras e reguladoras, através da ligação aos motivos RabF e às regiões *Switch I* e *II*, conseguiriam discriminar as proteínas da família Rab das demais famílias de GTPases, assim como verificar seu estado de ativação (ligação a GDP ou GTP). Além disso, a presença das regiões RabSF permitiria a ligação de moléculas efetoras, que devem ser capazes de interagir seletivamente com GTPases Rab de uma subfamília específica.

Enquanto as Rabs apresentam uma estrutura bastante conservada, seus efetores são bastante divergentes estruturalmente, o que é um reflexo da grande variedade de processos regulados por essas GTPases. Nesse âmbito, a determinação da estrutura de Rabs complexadas com seus respectivos efetores tem ajudado a desvendar os mecanismos estruturais que permitem



essa diversidade de tipos de ligações entre proteínas tão conservadas com uma ampla gama de proteínas tão estruturalmente distintas.

Figura 1.3: Representação de um modelo estrutural de GTPases da família Rab. (a) Estrutura cristalográfica da Rab3a (Dumas et al., 1999) complexada a uma molécula de GppNHp (em roxo), um análogo nãohidrolisável do GTP. O íon magnésio está representado por uma esfera laranja e as regiões Switch estão destacadas em azul. As alfahélices e folhas-beta estão representadas em verde. (b) Seqüência de aminoácidos representativa da família Rab, com os resíduos mais conservados (p > 0.5) destacados em letra maiúscula. As regiões RabF1-5 e RabSF1-4 estão destacadas em vermelho e azul-escuro, respectivamente. Em azul-claro estão destacados os motivos de ligação ao nucleotídeo, incluindo os que se ligam à base de guanina (G1-3) ou a fosfato e magnésio (PM1-3). As regiões formadoras de alfa-hélices (α), cadeias-beta (β) e *loops* (γ) estão indicadas acima da seqüência. Figura extraída de Stenmark e Olkkonen, 2001.

A principal conclusão a que se tem chegado a partir desses estudos é a de que a conservação de seqüência não implica necessariamente em uma mesma especificidade de ligação. A estrutura cristalográfica do complexo Rab3-Rabphilin3 mostrou, por exemplo, que uma tríade de aminoácidos hidrofóbicos em um dos *Switch* da Rab3 é importante para a formação deste complexo (Ostermeier e Brunger, 1999). Embora a Rab5 apresente a mesma tríade, esta GTPase não se liga a Rabphilin3 porque algumas poucas modificações em aminoácidos situados entre as regiões *Switch* promovem uma grande alteração conformacional na região da tríade, tornando-a indisponível para esta ligação (Merithew et al., 2001). Assim, apesar das Rabs apresentarem estruturas tão similares, variações aparentemente sutis são

capazes de produzir superfícies de interação bastante diversificadas, que permitem a interação específica de cada Rab com uma ampla gama de proteínas não-relacionadas.

1.2 – Resposta celular a nutrientes e a função de proteínas da via de sinalização sensível à rapamicina

A proteína Tip41 (*Tap42-interacting protein of 41 kDa*) foi inicialmente identificada em levedura como integrante da via de sinalização da quinase TOR (*Target of Rapamycin*), que atua no controle do crescimento celular em resposta à disponibilidade de nutrientes (Jacinto et al., 2001). Foi proposto um modelo em levedura (Fig. 1.4) em que a quinase TOR, ativada na presença de fontes de nitrogênio, promove a fosforilação da Tip41 e também a associação da proteína Tap42 com a fosfatase SIT4, que permanece inibida nessas condições. Quando falta nitrogênio no meio, ou, ainda, quando algum inibidor da TOR é empregado (rapamicina, por exemplo), a Tip41 desfosforilada e, portanto, ativa, interage com a Tap42, impedindo sua associação à SIT4. Desse modo a fosfatase SIT4 livre é capaz de se associar às SAPs (*SIT4-associated proteins*) e desfosforilar seus alvos, como o fator de transcrição GLN3 e a Serina/Treonina quinase NPR, envolvidos na utilização de fontes secundárias de nitrogênio (Jacinto et al., 2001).



Figura 1.4: Modelo proposto para a função da proteína Tip41 na via de sinalização da quinase TOR, em levedura. As setas representam as regulações positivas, enquanto as barras representam as negativas. Rap: rapamicina. A seta pontilhada entre a TOR e a proteína Tap42 indica que a fosforilação da Ta42 pela TOR (Jiang e Broach, 1999) desempenha um papel secundário na regulação da fosfatase SIT4. Figura extraída de Jacinto et al., 2001.

A quinase TOR é uma proteína evolutivamente conservada que pertence à família das quinases relacionadas às fosfatidilinositol-quinases e fosforila proteínas em resíduos de serina e treonina (Raught et al., 2001). A via de sinalização mediada pela TOR integra diversos sinais, incluindo fatores de crescimento e a disponibilidade de nutrientes e energia, para coordenar o crescimento e a proliferação celular. Diversos processos celulares são regulados por essa via, incluindo as fases de iniciação e elongamento da tradução, a biossíntese de ribossomos e tRNA, a transcrição, a organização do citoesqueleto de actina, o transporte de aminoácidos e a progressão do ciclo celular (Inoki e Guan, 2006; Hay e Sonenberg, 2004; Raught et al., 2001). Em mamíferos, é possível que a proteína Alpha-4, homóloga da Tap42, participe da via de sinalização da TOR, pois já foi demonstrado que a Alpha4 é capaz de se associar à fosfatase PP2A, homóloga da SIT4 (Chen et al., 1998; Nanahoshi et al., 1998). Além disso, também já foi demonstrado em mamíferos que a ativação da TOR inibe a atividade da fosfatase PP2A (protein phosphatase 2A), levando a fosforilação da S6-quinase ribossomal e das proteínas 4E-BP. Como essas proteínas estão relacionadas à inibição da tradução, sua fosforilação pela TOR antagoniza essa atividade inibitória, estimulando a síntese de proteínas e o crescimento celular (Hay e Sonenberg, 2004). Condizente com esses dados, sabe-se que as vias de sinalização que controlam a atividade da TOR estão freqüentemente ativadas em tumores humanos (Hay e Sonenberg, 2004). Assim, devido ao fato da Tip41 modular negativamente a via da quinase TOR em levedura, a investigação da sua homóloga em humanos, denominada TIPRL (*Tip41*, TOR signalling pathway regulator-like), é de grande interesse. Não existem ainda muitas informações publicadas a respeito da função da TIPRL, mas esta foi identificada por Matsuda et al., 2003, como uma possível ativadora de MAP quinases. Este fato sugere que a TIPRL deve exercer funções muito mais complexas em mamíferos, e que provavelmente está envolvida na regulação de eventos-chave de sinalização celular.

Através de uma varredura com o sistema duplo-híbrido de levedura utilizando a TIPRL como isca, J. Smetana isolou em nosso laboratório clones codificando a proteína MafB, um fator de transcrição contendo domínio bZIP. Esta interação não foi, até o momento, identificada em nenhuma outra espécie e mostra que a TIPRL pode estar diretamente envolvida em mecanismos de controle da expressão gênica.

1.3 - O fator de transcrição MafB

As proteínas da família Maf constituem uma importante classe de reguladores transcricionais envolvidos em processos de desenvolvimento, diferenciação e tumorigênese (Blank e Andrews, 1997; Motohashi et al., 1997). O primeiro membro isolado dessa família, *v-maf*, constitui um oncogene do retrovírus AS42 causador do fibrosarcoma musculoaponeurótico em aves e capaz de induzir a transformação de células CEF (*chicken embryo fibroblasts*) *in vitro* (Nishizawa, 1989). A partir daí muitos outros genes relacionados foram descritos em várias espécies, compondo uma família multi-gênica.

A família Maf está dividida em dois subgrupos: o das pequenas Mafs (149 a 162 aminoácidos), do qual fazem parte as proteínas MafF, MafG e MafK, e o das grandes Mafs (236 a 370 aminoácidos), composto por c-Maf, MafA, MafB e NRL (Swaroop et al., 1992; Yang-Feng e Swaroop, 1992; Kurschner e Morgan, 1995; Chesi et al., 1998; Wang et al., 1999; Kataoka et al., 2002). Todos os membros apresentam um domínio conservado bZIP (*basic-leucine zipper domain*) no C-terminal (Fig. 1.5), de interação com o DNA e também envolvido na formação de homo e heterodímeros (Blank e Andrews, 1997; Motohashi et al., 1997). Este domínio bZIP das Mafs possui uma alta similaridade de seqüência (maior que 40%) com o de outras proteínas contendo bZIP, principalmente em relação aos membros das famílias AP-1 e CREB/ATF. No entanto, dentro da família Maf o grau de similaridade é ainda maior e não apenas restrito ao domínio bZIP, mas também envolvendo as outras regiões dessas proteínas (Blank e Andrews, 1997).

As grandes Mafs se diferenciam das pequenas Mafs por apresentarem um domínio ácido no N-terminal, rico em prolina / serina / treonina, que atua na ativação transcricional (Fig. 1.5). Apesar de não possuírem um domínio de transativação, as pequenas Mafs também exercem um papel crucial na regulação da expressão gênica através da interação com outros fatores de transcrição ou por atuarem como repressores naturais (Blank e Andrews, 1997). Além do domínio de transativação e do bZIP, as Mafs apresentam uma seqüência altamente conservada *upstream* ao bZIP e denominada EHR (*extended homology region*) (Fig. 1.5), que parece auxiliar no reconhecimento de sítios específicos do DNA (Dlakic et al., 2001; Kerpola e Curran, 1994). Esses sítios, denominados MAREs (*Maf-recognition elements*), já estão bem estabelecidos e sabe-se que sua seqüência é bastante relacionada, principalmente em sua região

central, aos sítios denominados TRE (*phorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate (TPA) responsive element*) e CRE (*cyclic AMP responsive element*) que são reconhecidos por fatores de transcrição das famílias AP-1 e CREB/ATF (Kataoka et al., 1994). Já foi inclusive demonstrado que a especificidade de ligação ao DNA de homodímeros Maf se soprepõe parcialmente à da família Jun e Fos. Além disso, as Mafs podem formar heterodímeros com Jun e Fos que reconhecem preferencialmente seqüências de DNA não-palindrômicas apresentando meio sítio da seqüência MARE e a outra metade da seqüência TRE (Kataoka et al., 1994).

As grandes Mafs, com exceção da proteína NRL, possuem também uma região rica em *clusters* de glicina e histidina (*hinge region*) (Fig. 1.5), situada entre o domínio de ativação e a região EHR, cuja função ainda não está bem esclarecida. Foi proposta uma hipótese de que a região *hinge* é capaz de induzir modificações conformacionais no domínio de transativação, potencializando sua interação com outros fatores de transcrição (Yoshida e Yasuda, 2002).



Figura 1.5: Esquema representativo dos motivos estruturais presentes nas proteínas da família Maf. Em verde está representada a região básica que compõe o domínio bZIP juntamente com o zíper de leucinas, e, em azul, a região EHR, que também está presente tanto nas grandes quanto nas pequenas Mafs. A região rica em glicina e histidina está representada em laranja, enquanto que o domínio de ativação da transcrição está destacado em vermelho.

A proteína MafB, assim como as demais grandes Mafs, parece exercer um papel fundamental no desenvolvimento do sistema óptico (Mears et al., 2001; Ring et al., 2000), do rombencéfalo (Cordes e Barsh, 1994; Blanchi et al., 2003) e também na hematopoese (Kim et al., 1999; Onodera et al., 2000). O gene que codifica a MafB foi inicialmente denominado Krm1, pois foi identificado como sítio-alvo da mutação *"kreisler"* (*kr*) em camundongos

(Cordes e Barsh, 1994). Esta mutação corresponde a uma micro-inversão cromossomal induzida por raios-X, que compromete a expressão de MafB especificamente no 5° e 6° rombômeros do rombencéfalo embrionário (Cordes e Barsh, 1994). A mutação não afeta a seqüência codificadora da MafB, nem mesmo a região até 30kb upstream a ela, o que sugere que a região afetada constitui provavelmente algum elemento de controle tecido-específico da expressão de MafB (Eichmann, et al., 1997). Quando em homozigose, essa mutação promove um comportamento hiperativo em decorrência da segmentação anormal do rombencéfalo, além de perda auditiva devido à má-formação do ouvido interno (Deol, 1964, Frohman et al., 1993, McKay et al., 1994). Os demais tecidos apresentam níveis normais de MafB e, portanto, não são afetados (Eichmann et al., 1997). Sabe-se que os genes "hox" controlam a segmentação do rombencéfalo em vertebrados e estudos mostraram que a MafB ativa diretamente a expressão de Hoxb3 e Hoxa3 (Manzanares et al., 1999). A análise de camundongos homozigotos para um outro tipo de mutação no gene que codifica a MafB, denominada kr^{ENU} , demonstrou que a MafB também é expressa em células epiteliais do glomérulo renal (Sadl et al., 2003). Esta mutação, que consiste na troca da asparagina da posição 248 do domínio bZIP por uma serina, reduz consideravelmente a interação da proteína com o DNA, mas não compromete a sua estabilidade (Sadl et al., 2003). O fenótipo mais brando em relação ao desenvolvimento do rombencéfalo nesses camundongos indica que a MafB mutada conserva parte de suas funções, talvez pela interação com outros fatores bZIP ou co-fatores transcricionais (Sadl et al., 2003).

Existem outros trabalhos mostrando o efeito da inativação completa de MafB, através de camundongos *knock-out* (Blanchi et al., 2003, Moriguchi et al., 2006). Foram reportados defeitos severos na ritmogênese respiratória, causando óbito ao nascimento em decorrência de apnéia central (Blanchi et al., 2003), além de disgenesia renal grave, caracterizada por uma diferenciação glomerular anormal e apoptose de células tubulares renais (Moriguchi et al., 2006).

A proteína MafB atua em conjunto com LMaf/MafA e cMaf no desenvolvimento do cristalino em aves (Yoshida e Yasuda, 2002, Reza et al., 2007). Além disso, foi demonstrado em camundongo que MafB desempenha um papel importante no desenvolvimento do pâncreas endócrino, através da regulação da diferenciação embrionária tanto de células α (produtoras de glucagon) quanto de células β (produtoras de insulina) pancreáticas, embora em animais adultos a expressão de MafB esteja restrita às células α (Nishimura et al., 2006).

Em relação ao seu papel na hematopoese, estudos comprovaram a expressão de MafB em células mielomonocíticas e macrófagos, mas não em eritrócitos. MafB interage e reprime o fator Ets-1, conseqüentemente inibindo a transativação de genes essenciais para a diferenciação de eritrócitos, tais como o do receptor de transferrina (Sieweke et al., 1996). Além de atuar como inibidor da diferenciação de eritrócitos, Kelly et al., 2000, demonstraram que MafB é capaz também de estimular ativamente a via de diferenciação de monócitos a partir de progenitores hematopoiéticos. Assim, a proteína MafB parece desempenhar uma dupla função reguladora, simultaneamente ativando o programa de diferenciação específico de monócitos / macrófagos e inibindo o das outras linhagens celulares sangüíneas (Kelly et al., 2000; Bakri et al., 2005). Além disso, Hashizume et al, 2003, mostraram que a MafB é expressa também em linfócitos quiescentes, sofrendo inibição mediante estímulos de proliferação celular.

Sevinsky et al., 2004, publicaram resultados mostrando que a MafB é induzida na via de transdução de sinal da quinase ERK (*Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase*) e atua juntamente com os fatores GATA e ETS na ativação da expressão do marcador molecular CD41 na via de diferenciação de megacariócitos. Além disso, Sii-Felice et al., 2005, demonstraram que a proteína MafB e as demais grandes Mafs são fosforiladas pela quinase p38. Comprovaram, inclusive, que mutações nos resíduos-alvo da p38 comprometem consideravelmente a atividade biológica da MafA.

Em relação ao envolvimento das Mafs em processos de tumorigênese, a superexpressão de MafB e cMaf devido a translocação dos respectivos genes para o *locus* da imunoglobulina está associada a patogênese de alguns casos de mieloma múltiplo humano, constituindo um indicativo de mau prognóstico da doença (Zhan et al., 2006, Gabrea et al., 2006, Boersma-Vreugdenhil et al., 2004, Hanamura et al., 2001, Chesi et al., 1998). Os genes-alvo de cMaf/MafB cuja expressão é afetada nesta condição incluem o da ciclina D2 (CCND2), da molécula de adesão ITGB7, além de genes reguladores da forma e adesão celular (Lombardi et al., 2007).

Todos esses dados comprovam a importância funcional da MafB em uma grande diversidade de processos celulares, e a descoberta de novas vias de regulação da sua atividade são, portanto, de grande interesse. Através deste trabalho, comprovamos a interação da MafB humana, através do domínio bZIP, com a proteína TIPRL. Nossas análises funcionais apontam para um possível papel da TIPRL como um novo regulador da MafB.

2 – OBJETIVOS

Este trabalho abordou dois diferentes temas, um deles relacionado à análise estrutural de GTPases da família Rab e o outro ao estudo funcional da interação entre as proteínas TIPRL e MafB. Para o seu desenvolvimento, os seguintes objetivos foram estabelecidos:

- Determinar a estrutura cristalográfica da GTPase Rab11b, nas suas formas inativa (ligada ao GDP) e ativa (ligada ao GppNHp, um análogo não-hidrolisável de GTP).
- Realizar um estudo estrutural da GTPase Rab21, um membro ainda pouco estudado da família Rab.
- Realizar uma análise comparativa da estabilidade térmica das GTPases Rab11 e Rab21, por dicroísmo circular.
- 4) Confirmar a interação direta entre as proteínas TIPRL e MafB.
- Analisar a localização celular isolada e em conjunto das proteínas TIPRL e MafB, a fim de demonstrar que as mesmas co-localizam na célula.
- 6) Esclarecer o papel da TIPRL na regulação da atividade da MafB.

3 – RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados em três capítulos. O primeiro deles consiste em um artigo já publicado, contendo a análise da estrutura cristalográfica da GTPase Rab11b. O segundo capítulo descreve os ensaios de cristalização da Rab21, assim como os estudos comparativos de termo-estabilidade das GTPases Rab21 e Rab11. O terceiro e último capítulo corresponde a um manuscrito reunindo os dados acerca do estudo da interação entre as proteínas TIPRL e MafB.

3.1 – Artigo I

The crystal structure of the small GTPase Rab11b reveals critical differences relative to the Rab11a isoform

Sandra M. N. Scapin, Flávia R. G. Carneiro, Adriana C. Alves, F. Javier Medrano, Beatriz G. Guimarães e Nilson I. T. Zanchin



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Structural Biology 154 (2006) 260-268

Journal of Structural Biology

www.elsevier.com/locate/yjsbi

The crystal structure of the small GTPase Rab11b reveals critical differences relative to the Rab11a isoform

Sandra M.N. Scapin, Flávia R.G. Carneiro, Adriana C. Alves, F. Javier Medrano, Beatriz G. Guimarães *, Nilson I.T. Zanchin *

Center for Structural Molecular Biology, Brazilian Synchrotron Light Laboratory, LNLS, P.O. Box 6192, CEP 13084-971, Campinas, SP, Brazil

Received 14 December 2005; received in revised form 13 January 2006; accepted 18 January 2006 Available online 20 February 2006

Abstract

Rab GTPases constitute the largest family of small monomeric GTPases, including over 60 members in humans. These GTPases share conserved residues related to nucleotide binding and hydrolysis, and main sequence divergences lie in the carboxyl termini. They cycle between inactive (GDP-bound) and active (GTP-bound) forms and the active site regions, termed Switch I and II, undergo the larger conformational changes between the two states. The Rab11 subfamily members, comprising Rab11a, Rab11b, and Rab25, act in recycling of proteins from the endosomes to the plasma membrane, in transport of molecules from the trans-Golgi network to the plasma membrane and in phagocytosis. In this work, we describe Rab11b-GDP and Rab11b-GppNHp crystal structures solved to 1.55 and 1.95 Å resolution, respectively. Although Rab11b shares 90% amino acid identity to Rab11a, its crystal structure shows critical differences relative to previously reported Rab11a structures. Inactive Rab11a formed dimers with unusually ordered Switch regions and missing the magnesium ion at the nucleotide binding site. In this work, inactive Rab11b crystallized as a monomer showing a flexible Switch I and a magnesium ion which is coordinated by four water molecules, the phosphate β of GDP (β -P) and the invariant S25. S20 from the P-loop and S42 from the Switch I are associated to GTP hydrolysis rate. In the active structures, S20 interacts with the γ-P oxygen in Rab11b-GppNHp but does not in Rab11a-GppNHp and the Q70 side chain is found in different positions. In the Rab11a-GTPyS structure, S40 is closer to S25 and S42 does not interact with the γ -P oxygen. These differences indicate that the Rab11 isoforms may possess different GTP hydrolysis rates. In addition, the Switch II of inactive Rab11b presents a 3_{10} -helix (residues 69–73) that disappears upon activation. This 3_{10} -helix is not found in the Rab11a-GDP structure, which possesses a longer $\alpha 2$ helix, spanning from residue 73 to 82 α -helix 5. © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Human Rab GTPases; Crystal structure; GTP binding

1. Introduction

Rab GTPases have been found in all eukaryotes, constituting the largest family of small monomeric GTPases. The human genome encodes over 60 Rab GTPases and most are ubiquitously expressed (Seabra et al., 2002). As all of the small monomeric GTPases, Rabs cycle between inactive GDP- and active GTP-bound forms and the active site regions, termed Switch I and II, undergo the larger conformational changes between the two states. In the active form, they interact with effector proteins to regulate specific trafficking events such as vesicle docking, budding, motility or fusion (Stein et al., 2003). They share conserved residues related to nucleotide binding and hydrolysis and main sequence divergences lie in the carboxyl termini, which are believed to be responsible for their differences in subcellular targeting, although other regions may also be involved in proper localization (Ali et al., 2004; Chavrier et al., 1991).

The Rab11 subfamily comprises Rab11a and Rab11b, sharing 90% amino acid identity, and Rab25. This subfamily acts in recycling of proteins from the endosomes to the plasma membrane, in polarized transport in epithelial cells,

^{*} Corresponding authors. Fax: +55 19 3512 1004.

E-mail addresses: beatriz@lnls.br (B.G. Guimarães), zanchin@lnls.br (N.I.T. Zanchin).

^{1047-8477/\$ -} see front matter @ 2006 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.jsb.2006.01.007

in the transport of molecules of the trans-Golgi network to the plasma membrane and in phagocytosis (Chen et al., 1998; Cox et al., 2000; Ullrich et al., 1996; Wang et al., 2000). The family of Rab11 interacting proteins, FIPs, comprises three classes of proteins that, in addition to the C-terminal conserved Rab11/25 binding domain (Meyers and Prekeris, 2002), contain either a C2 domain (Class I: Rip11, FIP2, and RCP) or two EF-hand domains and a proline rich region (Class II: FIP3/eferina, FIP4), or lack any other conserved domain (Class III: FIP1) (Prekeris, 2003). An intriguing question concerns the mechanism by which Rab GTPases generate specificity for a diverse spectrum of effectors and regulatory factors. Calorimetric studies have shown that the FIPs cannot distinguish between Rab11a and Rab11b in vitro, suggesting that they might play redundant roles in the cell (Junutula et al., 2004).

The crystal structure of Rab11a has already been determined, describing the GDP-bound form as a dimer with the Switch I and II regions involved in monomer interaction (Pasqualato et al., 2004). This finding led to the hypothesis that inactive Rab11a could dimerize in vivo and cycle between the GDP- and GTP-bound forms on the membranes without recycling to the cytosol. A crystallographic dimer involving the Switch regions has also been described for Rab9 (Wittmann and Rudolph, 2004). However, the interaction is different relative to monomer orientation. In Rab9, the C-termini of the monomers show opposite orientation whereas in Rab11a they are located on the same side of the dimer. The monomer-interacting areas of Rab11a $(\sim 2000 \text{ Å}^2)$ and Rab9 (1200 Å^2) dimers fall inside the biologically functional range of interacting areas observed for protein complexes $(1600 \pm 400 \text{ Å}^2)$ (Le Conte et al., 1999) but, so far there is no experimental evidence that Rab9 and Rab11a can dimerize in solution. Soluble dimers have been described for the Cdc42, Rac2, RhoA, and Rac1 members of the Rho family of small monomeric GTPases (Zhang and Zheng, 1998; Zhang et al., 2001). However, in these cases, the interactions occur specifically via the carboxylterminal region, not involving Switch I and II.

In this work, we describe Rab11b crystal structures of both inactive and active forms. Comparison of Rab11b to the previously reported Rab11a structures revealed a different oligomerization state for the inactive Rab11 form. In addition, each Rab11 isoform displays several unique interactions in the nucleotide binding site. These differences are intriguing because they share 90% sequence identity and indicate that these two isoforms may show different GTP binding or hydrolysis rates.

2. Materials and methods

2.1. Construction of expression vectors

The coding sequence of Rab11b GTPase (NCBI Accession No. XM_058232.3) was initially PCR-amplified from a human fetal brain cDNA library (Clontech) using oligonucleotides ONZ60 (5'-ACG GCA TAT GGG GAC CCG

AGA CGA CGA G-3') and ONZ61 (5'-TGG AGG ATC CGC ACG CAC GCT GGG TGG AG-3'), and inserted into the NdeI and BamHI restriction sites of the Escherichia *coli* expression vector pET28a (Novagen, Inc.), producing vector pET28-Rab11b. A second expression vector was constructed to express a truncated Rab11b form containing amino acids 8-205. For this purpose, the Rab11b cDNA cloned into pET28a was used as a template in a PCR with oligonucleotides ONZ159 (5'-GGG GGA TCC TCA GTC CGT GGT GGG CGG CAC G-3') and ONZ160 (5'-GAC CAT ATG TAC GAC TAC CTA TTC AAA GTG G-3'). The resulting PCR product was cloned into the *NdeI* and BamHI sites of E. coli vector pCYTEXP3 (Schneppe et al., 1994), producing vector pCYTEX-Rab11b. The sequence of the expression vectors were verified by DNA sequencing analysis using an ABI Prism 377 DNA sequence analyzer (Applied Biosystems).

2.2. Expression and purification of Rab11b

Rab11b was expressed in E. coli strain DH5a transformed with vector pCYTEX-Rab11b. Cells were grown at 30 °C in LB medium containing ampicillin $(50 \,\mu g \,m l^{-1})$ to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.8-1.0 and protein expression was induced by heat-shock at 42 °C for 2 h. The frozen bacterial pellet from 2 L cultures was lysed in 50 ml of buffer A (20mM Tris-HCl, pH 8.5, 20mM NaCl, 0.1 mM DTT, 1 mM MgCl₂) containing 0.5 mM PMSF and $50\,\mu\text{g}\,\text{m}\text{l}^{-1}$ lysozyme for 1 h on ice. Cell extracts were isolated by sonication in a Branson sonifier (Branson Ultrasonics, Co) and centrifugation at 20000g for 30 min at 4 °C. For Rab11b purification, the extract was loaded onto a 45 cm³ DEAE-Sepharose FF ion-exchange column equilibrated in buffer A. Rab11b was eluted with a 450 ml (10 column volumes, CV) linear gradient from 20 to 200mM NaCl in buffer A. Fractions enriched with Rab11b were pooled, dialyzed against buffer A and loaded onto a 16 cm³ Q-Sepharose HP column, which was eluted using a 160 ml (10 CV) gradient from 20 to 300 mM NaCl in buffer A. Rab11b eluted from this column at approximately 100 mM NaCl. Further purification was performed with a Superdex 75 16/60 column using a buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 1 mM MgCl₂. Approximately 60 mg of pure Rab11b were obtained with this expression system. All chromatographic procedures were performed using an ÄKTA-FPLC system and columns purchased from GE-Healthcare (former Amersham Biosciences). Protein concentration was estimated from direct absorbance at 280 nm in guanidine buffer (7.2 M guanidine-HCl, 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.55) considering an extinction molar coefficient of $\varepsilon_{280} = 21620 \,\mathrm{M}^{-1} \,\mathrm{cm}^{-1}$ for Rab11b.

2.3. Nucleotide exchange

The GDP molecule that co-purifies with recombinant Rab11b and Rab11a was exchanged against GppNHp by incubating the purified proteins with 5 mM GppNHp, 5 mM MgCl₂ and 5 U of calf intestinal alkaline phosphatase per milligram of protein at room temperature for 16 h. The excess nucleotide and alkaline phosphatase were subsequently removed by gel-filtration with a Superdex 75 16/60 column using buffer containing 10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 1 mM MgCl₂.

2.4. Gel-filtration analysis of Rab11b

Gel-filtration experiments were performed on a Superdex 75 16/60 column. The molecular weight markers used were bovine serum albumin (67 kDa, 7 mg ml⁻¹); ovalbumin (43 kDa, 7 mg ml⁻¹); chymotrypsinogen (25 kDa, 3 mg ml⁻¹), and ribonuclease A (14 kDa, 10 mg ml⁻¹). Both the molecular weight markers and the sample were prepared in buffer containing 10 mM Tris–HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, and 1 mM MgCl₂. Additional analyses were performed with the same buffer containing also 0.1% Tween 20 or 9 mM deoxycholate.

2.5. Crystallization and diffraction data collection

Crystallization systems and reagents were purchased from Hampton Research and Jena Bioscience and proteins were crystallized by the hanging-drop vapor-diffusion method using 24-well plates at 18°C. Rab11b was crystallized in its inactive (Rab11b-GDP) and active (Rab11b-Gpp-NHp) forms. First crystals of the Rab11b-GDP complex were grown in drops containing equal volumes (2 µl) of protein sample (30 mg ml⁻¹ in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM MgCl₂), and reservoir solution (0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 30% PEG 4000, and 0.2 M sodium acetate), equilibrated against 300 µl of reservoir solution. Withdrawal of sodium acetate from the crystallization solution improved crystal morphology. Crystals were further optimized by testing PEG 4000 concentrations ranging from 25 to 32% and pH from 8.0 to 9.0. Crystals for data collection (reaching up to 500 µm at the maximum dimension) were obtained in the condition containing 30% PEG 4000 and 0.1 M Tris-HCl, pH 8.8. Rab11b-GppNHp did not crystallize under the same conditions as Rab11b-GDP. Therefore, a crystallization screen of the Rab11b-GppNHp complex was performed using $2 \mu l$ of protein at 68 mg ml^{-1} in 10 mMTris-HCl, pH 7.4, and 0.1 mM MgCl₂, which were mixed with equal volumes of the reservoir solutions and equilibrated against 300 µl of reservoir solutions. Crystals used for data collection ($\sim 100 \,\mu m$ at the maximum dimension) were formed in the condition 41 of the Hampton Research Crystal Screen II (0.1 M Tris-HCl, pH 8.5, 10 mM NiCl₂, and 1 M Li₂SO₄).

Crystals were transferred directly into a cryoprotectant solution which contained the respective reservoir solutions used to crystallize inactive and active Rab11b supplemented with 25% glycerol. Crystals were flash-cooled under a nitrogen stream at 100 K and complete data sets were collected at the protein crystallography beam line D03B-MX1

Table 1 Data collection statistics (values in parenthesis are for the outer resolution shell)

	Rab11b-GDP	Rab11b-GppNHp
Beam line	LNLS D03B	LNLS D03B
Wavelength (Å)	1.430	1.430
Space group	$P2_{1}2_{1}2_{1}$	$I2_{1}2_{1}2_{1}$
Unit-cell parameters (Å)	a = 45.79	a = 66.61
	b = 52.22	b = 85.41
	c = 59.35	c = 86.87
Resolution limits (Å)	39.22-1.55 (1.63-1.55)	60.86-1.95 (2.06-1.95)
Total observations	141 959	168 903
Unique reflections	21134	18 222
Multiplicity	6.7 (6.4)	9.2 (9.0)
Completeness (%)	99.8 (99.5)	99.8 (100.0)
Rsymm (%)	6.2 (37.7)	9.0 (33.1)
Mean I/ $\sigma(I)$	18.4 (5.0)	19.3 (6.6)

of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory, using a MAR165 CCD detector at a wavelength of 1.430 Å. Data were processed using the programs MOSFLM (Leslie, 1992) and SCALA (Blessing, 1995; Evans, 1993; Kabsch, 1988) from the CCP4 package (Collaborative Computational Project 4, 1994). Crystals of inactive Rab11b (Rab11b-GDP) diffract to 1.55 Å resolution and belong to the space group $P2_12_12_1$ whereas crystals of Rab11b in complex with the non-hydrolyzable GTP analogue Gpp-NHp diffracted to 1.95 Å resolution and belong to the space group $I2_12_12_1$. A summary of the data collection statistics is shown in Table 1.

2.6. Structure solution and refinement

The crystal structures were solved by molecular replacement methods using the program AMoRe (Navaza, 1994) as implemented in the CCP4 program suite. The structure of Rab11a (PDB code 10IV, Pasqualato et al., 2004) was used as the search model to determine the structure of Rab11b-GDP. The Rab11b-GDP structure, excluding the Switch I and II regions, was used as the starting model to determine the structure of Rab11b-GppNHp. The structures were refined using Refmac5 (Murshudov et al., 1997). Refinement cycles were alternated with visual inspection of the electron density maps and model rebuilding with the program O (Jones and Kjeldgard, 1997). During the final cycles water molecules were introduced using the program ARP/WARP (Lamzin and Wilson, 1993). The final models present an R_{factor} of 0.186 ($R_{\text{free}} = 0.238$) and R_{factor} of 0.163 ($R_{\text{free}} = 0.205$) for Rab11b-GDP and Rab11b-GppNHp respectively, with good overall stereochemistry. As defined by the program PROCHECK (Laskowski et al., 1993) all non-glycine and non-proline residues fall in the most favored or additionally allowed regions of the Ramachandran plot. Further details of refinement are presented in Table 2. Rab11b-GDP and Rab11b-GppNHp atomic coordinates were deposited in the Protein Data Bank under the codes 2F9L and 2F9M, respectively.

Table 2 Refinement statistics

	Rab11b-GDP	Rab11b-GppNHp
Resolution range (Å)	39.22-1.55	60.86-1.95
No. of reflections	20119	17 437
No. of protein/ligand/water atoms	1341/29/185	1456/33/286
R_{factor} (%)	18.6	16.3
$R_{\rm free}$ (%)	23.8	20.5
RMS deviations from ideality		
Bond lengths (Å)	0.014	0.009
Bond angles (degrees)	1.720	1.263
Ramachandran plot (%)		
Most favored regions	92.4	94.7
Additional allowed regions	7.6	5.3
Average <i>B</i> -factor (Å ²)		
Main chain/side chain	15.72/17.58	14.03/16.36
Ligand/solvent	10.82/30.83	10.43/31.58

3. Results and discussion

3.1. Overall Rab11b structure

Attempts to crystallize the full-length Rab11b protein have failed and, since the N- and C-terminal flexible regions of small GTPases are known to interfere with crystallization, a construct was made to remove seven residues form the N-terminal and 13 from the C-terminal regions of Rab11b, so that the variant used in this work includes amino acids 8 to 205 with an additional methionine at the N-terminus. The crystal structures of GDP- and GppNHpbound forms were refined at 1.55 and 1.95 Å resolution, respectively. In both cases, Rab11b crystallized as a monomer in the asymmetric unit. The final atomic model of inactive Rab11b includes residues 7–182, a bound GDP molecule and a magnesium ion. The quality of the electron density maps did not allow modeling of residues 39–41 of the Switch I, which is consistent with the fact that Rab



Fig. 1. Overall structure of Rab11b. (A) Sequence of Rab11b showing the secondary structure elements of the inactive and active forms. The amino acid substitutions in Rab11a are indicated in below the Rab11b sequence. The 3_{10} -helix present only in inactive Rab11b is indicated in cyan. α -Helix 5 is longer in the active form (extension indicated in magenta). (B) Superposition of inactive and active Rab11b structures. The Switch I and II regions are shown in blue and Rab11b-GDP is represented in lighter colors.

inactive forms usually show a mobile Switch I region. The final model of the Rab11b-GppNHp complex includes residues 7–188. The structure of monomeric Rab11b shows the typical Ras-like, small GTPase fold with a six stranded β -sheet core (β 1– β 6) surrounded by five α -helices (α 1– α 5) (Fig. 1). Superposition of Rab11b-GDP and Rab11b-Gpp-NHp structures results in an overall RMS deviation of 0.79 Å (165 C α aligned).

Major conformational differences in the two forms of Rab11b involve helices $\alpha 2$ and $\alpha 5$. In the GDP-bound complex, amino acids 69–73 form a 3₁₀-helix followed by an $\alpha 2$ (residues 77–82) smaller than the one present in other Rab structures. In the GppNHp-bound complex, the 3₁₀-helix disappears whereas $\alpha 2$ remains (Fig. 1). This change in the $\alpha 2$ region upon activation is observed only for the Rab11 isoforms. Other Rab proteins contain a conserved and longer α -helix in the Switch II region (Fig. 2). As for $\alpha 5$, while in the Rab11b-GDP complex this α -helix includes residues 161–178, Rab11b-GppNHp shows an $\alpha 5$ spanning from amino acid 161 to 188 (Fig. 1), indicating a stabilization of the 179–188 region following binding to GppNHp.

The crystal structure of the Rab11a isoform bound to GDP and of a Rab11a Q70L variant bound to GTP γ S was described by Pasqualato et al. (2004). These authors have reported that inactive Rab11a crystallized as a dimer in the asymmetric unit. By contrast, both the GDP- and the GppNHp-bound Rab11b structures show a single crystallographically independent monomer. Superposition of Rab11b monomers and Rab11a-GDP and Rab11a(Q70L)-GTP γ S results in overall RMS deviation of 0.90 Å (153 C α aligned) and 0.55 Å (166 C α aligned) for the inactive (Fig. 3) and active forms, respectively. A second crystal structure of the active Rab11a bound to GppNHp was reported by Eathiraj et al. (2005). Superpo-



Fig. 2. Structural comparison of the Switch I and II regions of active Rabs. Rab11a and Rab11b possess closely related Switch II and differ from other Rabs that contain helical Switch II. In the Switch I region, the differences are not significant. For best visualization, only the core of Rab11b is shown.

sition of Rab11a and Rab11b bound to GppNHp results in overall RMS deviation of 0.44 (168 C α aligned). Despite the similarity, the overall alignment for the isoforms shows some differences in the Switch regions for the Rab11-GDP complexes. As mentioned above, the Rab11b-GDP structure lacks residues 39-41 of Switch I in contrast to inactive Rab11a structure in which the entire region could be modeled. The conformational differences between the Switch regions of inactive Rab11a and Rab11b could be in part explained by the dimerization of Rab11a-GDP in the crystal, which is consistent with the proposal that in inactive Rabs the Switch regions are either disordered or influenced by crystal contacts (Eathiraj et al., 2005). The Switch II of inactive Rab11b presents a 310-helix (residues 69-73) that disappears upon activation. This 3₁₀-helix is not found in the Rab11a-GDP structure, which possesses a longer $\alpha 2$ helix, spanning from residue 73 to 82. (Fig. 3A).

3.2. Analysis of the oligomerization state of Rab11

Inactive Rab9 and Rab11a have been crystallized as dimers (Pasqualato et al., 2004; Wittmann and Rudolph, 2004) and both dimers show large interaction interfaces $(2000 \text{ Å}^2 \text{ in Rab11a and } 1200 \text{ Å}^2 \text{ in Rab9})$ and it has been speculated that Rab proteins can form dimers in vivo. Dimerization of the Rho family GTPases Cdc42, Rac2, and RhoA in solution has been described (Zhang and Zheng, 1998). In the case of Cdc42 and Rac2, it was also shown that dimerization leads to an increase of the intrinsic GTPase activity (Zhang and Zheng, 1998). It is important to point out that dimerization of Rho family members takes place via the C-terminal region, not involving the Switch I and II regions. The Rab11a-GDP crystal structure showed a dimer in the asymmetric unit, but assays to detect Rab11a dimers in solution have not been successful (Pasqualato et al., 2004). The Rab11a dimer interface buries large fractions of Switch I and Switch II regions, which are normally involved in the interactions of Rab proteins with their partners. In this work, size exclusion chromatography was performed to determine the molecular weight of inactive Rab11b under various conditions, including in the presence of detergents intended to simulate a membrane-like environment, as proposed previously to explain Rab11a dimer formation (Pasqualato et al., 2004), but no dimer could be detected (data not shown). Both inactive and active Rab11b have crystallized as monomers in the asymmetric unit and analysis of the neighbors in the crystal lattice did not reveal any possible dimer. Some Rab11b sequences in the database contain an arginine residue at position 75 of the Switch II region but the isoform used in this work contains an alanine in this position, showing amino acid identity to Rab11a up to residue 147 (Fig. 1A). Structural alignment of inactive forms of Rab11a and Rab11b shows that the amino acid substitutions are far away from the Rab11a dimer interface making the difference in their quaternary structures unexpected (Fig. 3B). Furthermore, analysis of the Rab11a dimer using the PISA webserver

A GDP SWI COP SWI COP

Fig. 3. Stereo view of C- α superposition of Rabl1a (green) and Rabl1b (magenta) GTPases. The Switch regions, that undergo large conformational changes during the GDP/GTP cycle, are highlighted. (A) In its inactive form, Rabl1b crystallized as a monomer in complex with a GDP molecule and a magnesium ion. Rabl1a-GDP crystallized as a dimer and lacks the bound magnesium ion at the nucleotide binding site. Rabl1b-GDP structure lacks residues 39–41 from Switch I. (B) Rabl1b side chains corresponding to amino acid substitutions between the isoforms are shown. Note that the substitutions are far from the Rabl1a dimer interface. A single monomer of Rabl1a is represented.

(http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html), that calculates protein assemblies from crystal structures based on general principles of chemical thermodynamics (Krissinel and Henrick, 2005), revealed that the theoretical ΔG values for association and dissociation of the Rab11a monomers are about -9 and 3 kCalmol⁻¹, respectively, which indicates a weak binding, despite the large surface area buried in the dimers. Based on these analyses, we are confident that the monomer described in this work for inactive Rab11b represents a biologically functional intermediate of the protein. The crystal structure alone did not suggest a mechanism for Rab dimerization neither revealed a reason why the two isoforms would present different quaternary structures.

3.3. Interactions in the nucleotide binding site

The nucleotide binding site of the monomeric Rab11b-GDP complex shows interactions between the phosphate groups of GDP and the conserved amino acids of the Ploop (residues 18-25) that are typical of small GTPases. The binding site also displays a disordered Switch I and a magnesium ion coordinated by four water molecules, the phosphate β of GDP (β -P) and the invariant serine 25 (Fig. 4A). The Rab11a-GDP dimer, in contrast, lacks the bound magnesium ion at the nucleotide binding site (Pasqualato et al., 2004). In the Rab11a-GDP crystal, the Switch regions assume an unusually ordered conformation, probably due to stabilizing contacts present in the large dimeric interface. The unusually ordered Rab11a-GDP Switch I region and the resulting interaction of S40 with the α -P and the ribose of GDP contribute to maintain the nucleotide tightly bound in the absence of magnesium (Pasqualato et al., 2004). In addition, the invariant Mgbinding S25 from the P-loop shows an unusual conformation and interacts with α -P instead of β -P of the GDP (Fig. 4A). The amino acid sequence of the Rab11b variant used in this work is identical to Rab11a up to amino acid


Fig. 4. Superposition of the nucleotide binding sites of Rab11a (green) and Rab11b (magenta) structures. The side chains of residues involved in nucleotide stabilization are shown. Magnesium ions found in Rab11a and Rab11b structures are shown as green and magenta spheres, respectively, and their coordinating water molecules as red spheres. Interactions are represented as green and magenta dotted lines for Rab11a and Rab11b structures, respectively. Interactions that are present in both structures are represented only for Rab11b in black lines. (A) Nucleotide interactions of inactive Rab11a and Rab11b. The ordered Rab11a-GDP Switch I region and the resulting interaction of S40 with the α -P and the ribose of GDP contribute to maintain the nucleotide tightly bound in the absence of magnesium. The invariant Mg-binding S25 from the P-loop of inactive Rab11a shows an unusual conformation and interacts with α -P instead of β -P of GDP. (B) Nucleotide interactions of active Rab11a (Rab11a-Q70L-GTP γ S) and Rab11b (Rab11b-GppNHp). In contrast with active Rab11b and other active Rab structures, neither S20 from the P-loop nor S42 from Switch I of Rab11a(Q70L)-GTP γ S interact with the γ -P oxygen. S40 is also displaced. The Q70L mutation of active Rab11a is also shown. (C) Nucleotide interactions of active Rab11a (Rab11a-GppNHp) and Rab11b (Rab11b-GppNHp). S40 and S42 show a good overlapping in both structures and S20 does not interact with the γ -P oxygen of Rab11a-GppNhp. Q70 side chain is found in different positions.

147, which includes the Switch regions (Fig. 1A), making the structural differences between these two GTPases unexpected.

Although superposition of the Rab11a(Q70L)-GTP γ S and Rab11b-GppNHp structures shows a close alignment with a small displacement in the Switch regions, several key

differences in side chain conformation of the residues involved in GTP hydrolysis are observed. In contrast to active Rab11b and other Rab structures, neither S20 from the P-loop nor S42 from the Switch I of active Rab11a(Q70L)-GTP γ S are in position to interact with the γ -P oxygen (Fig. 4B). These residues are associated with the intrinsic GTPase hydrolytic rate, and the conformational differences suggest that the Rab11 isoforms could differ in hydrolysis kinetics. S40 is also displaced in the Rab11a(Q70L)-GTP γ S structure, but it is not known if it can interfere with the hydrolysis process (Fig. 4B). The Q70L mutation introduced in Rab11a was intended to generate a stable GTP γ S-bound form, however the mutant showed GTP hydrolysis rates similar to the wild-type protein (Pasqualato et al., 2004). Furthermore, it is not clear what would be the effect of having a sulfur atom bound to γ -P instead of an oxygen. Interestingly, both S40 and S42 show a good overlapping when the Rab11a-GppNHp (Eathiraj et al., 2005) and Rab11b-GppNHp structures are compared.

Q70 is highly conserved and has been a frequent target for mutagenesis to generate constitutively active GTPases and it is not possible to predict to which extent this mutation influences S20 and S42 positions in the Rab11a(O70L)-GTPvS structure. In this context, it is important to compare the interactions of the nucleotide binding site of Rab5a that was described for the active wild-type and A21P hydrolysis deficient mutant proteins (Zhu et al., 2003, 2004). Mutations in the position equivalent to S20 in the Ras GTPase have been associated to a slower GTP hydrolysis rate and increased biological activity (Seeburg et al., 1984). The A21P substitution in Rab5a resulted in a hydrolysis deficient mutant (Zhu et al., 2003, 2004) and did not affect the correct position of S20, but affected the side chain position of S42, compromising its interaction with the γ -P of GTP (Fig. 5). Interestingly, a significant conformational difference between active Rab11b and Rab5a crystal structures involves Q70 (Fig. 5), which does not interact with the γ -P of GppNHp in Rab11b but interacts with the γ -P of GTP of Rab5a (Zhu et al., 2003).



Rab11b-GppNHp

Fig. 5. Active site of the hydrolysis deficient Rab5a A21P mutant (PDB code 1N6L) crystallized in complex with GTP, showing the side chains of residues probably involved in hydrolysis (cyan). Residues at equivalent positions in wild-type Rab5a-GppNHp and Rab11b-GppNHp are colored yellow and pink, respectively. Residues are numbered according to Rab11b amino acid positions. Serine 20 and 42 are usually mentioned as determinants of hydrolytic rate. The A21P mutation promoted the loss of interaction between the side chain of S42 and the γ -P of GTP in Rab5a. Q70 also shows significant conformational change, which does not interact with the γ -P of GTP in Rab11b.

Hydrolysis deficient mutants are usually crystallized bound to GTP, not requiring a non-hydrolyzable GTP analog. This is not the case for the Rab11a O70L substitution which did not affect its GTP hydrolysis rate (Pasqualato et al., 2004). Therefore, it is expected that the Q70L mutation in Rab11a did not influence the side chain position of S20 and S42. A comparison of Rab11b-GppNHp and Rab11a-GppNHp (Eathiraj et al., 2005) shows that the Q70 side chain is found in different positions (Fig. 4C) and in both cases does not interact with the γ -P oxygen, as opposite to Rab5a. An effective reduction of the GTP hydrolysis rate for Rab11a was achieved using a S20V mutant (Chen and Wandinger-Ness, 2001). Interestingly, S20 does not interact with γ -P oxygen of both Rab11a(Q70L)-GTP γ S and Rab11a-GppNHp but interacts with this oxygen of Rab11b-GppNHp, Rab5a(A21P)-GTP, and Rab5a-Gpp-NHp (Figs. 4 and 5).

In conclusion, the differences observed in the side chains of S20, S40, and S42 of active Rab11b relative to Rab11a indicate that these closely related isoforms may present different GTP hydrolysis rates. In addition, the conformational "flexibility" of Q70 may also be a factor affecting the process of GTP hydrolysis among the different Rab proteins.

Acknowledgments

This work was supported by Grant 00/02788-4 and the SMolBNet and CEPID/CBME programs from the Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP). S.M.N.S. and F.R.G.C. are recipients of FAPESP pre-doctoral fellowships. We thank Tereza C. Lima Silva for technical support, Zildene G. Correa and Luciana R. Camillo for DNA sequencing.

References

- Ali, B.R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M., Seabra, M.C., 2004. Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. J. Cell Sci. 117, 6401–6412.
- Blessing, R.H., 1995. An empirical correction for absorption anisotropy. Acta Crystallogr. A51, 33–38.
- Chavrier, P., Gorvel, J.P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J., Zerial, M., 1991. Hypervariable C-terminal domain of Rab proteins acts as a targeting signal. Nature 353, 769–772.
- Chen, W., Feng, Y., Chen, D., Wandinger-Ness, A., 1998. Rab11 is required for trans-Golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. Mol. Biol. Cell 9 (11), 3241–3257.
- Chen, W., Wandinger-Ness, A., 2001. Expression and functional analyses of Rab8 and Rab11a in exocytic transport from trans-Golgi network. Methods Enzymol. 329, 165–175.
- Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. The *CCP4* suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr. D 50: 760–763.
- Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J., Greenberg, S., 2000. A Rab11containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 680–685.
- Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C., Lambright, D.G., 2005. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. Nature 436 (7049), 415–419.

- Evans, P.R., 1993. Data reduction, Proceedings of CCP4 Study Weekend on Data Collection & Processing, pp. 114–122.
- Jones, T.A., Kjeldgard, M., 1997. Electron-density map interpretation. Methods Enzymol. 277, 173–208.
- Junutula, J.R., Schonteich, E., Wilson, G.M., Peden, A.A., Scheller, R.H., Prekeris, R., 2004. Molecular characterization of Rab11 interactions with the members of family of Rab11-interacting proteins (FIPs). J. Biol. Chem. 279 (32), 33430–33437.
- Kabsch, W., 1988. Evaluation of single-crystal X-ray diffraction data from a position-sensitive detector. J. Appl. Crystallogr. 21, 916–924.
- Krissinel, E., Henrick, K., 2005. Detection of Protein Assemblies in Crystals. In: Berthold, M.R. (Ed.), CompLife 2005, LNBI 3695 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 163–174.
- Lamzin, V.S., Wilson, K.S., 1993. Automated refinement of protein models. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 49 (1), 129–147.
- Laskowski, R.A., Moss, D.S., Thornton, J.M., 1993. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. J. Mol. Biol. 231 (4), 1049–1067.
- Le Conte, L., Chothia, C., Janin, J., 1999. The atomic structure of protein– protein recognition sites. J. Mol. Biol. 285 (5), 2177–2198.
- Leslie, A.G.W., 1992. Joint CCP4 and ESF-EACMB. In: Newsletter on Protein Crystallography, vol. 26. Daresbury Laboratory, Warrington, UK.
- Meyers, J.M., Prekeris, R., 2002. Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function. J. Biol. Chem. 277 (50), 49003–49010.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J., 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 53 (3), 240–255.
- Navaza, J., 1994. AMoRe: an automated package for molecular replacement. Acta Crystallogr. A 50, 157–163.
- Pasqualato, S., Senic-Matuglia, F., Renault, L., Goud, B., Salamero, J., Cherfils, J., 2004. The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. J. Biol. Chem. 279 (12), 11480–11488.

- Prekeris, R., 2003. Rabs, Rips, FIPs and endocytic membrane traffic. Sci. World J. 3, 870–880.
- Schneppe, B., Eichner, W., McCarthy, J.E., 1994. Translational regulation of a recombinant operon containing human platelet-derived growth factor (PDGF)-encoding genes in *Escherichia coli*: genetic titration of the peptide chains of the heterodimer AB. Gene 143 (2), 201–209.
- Seabra, M.C., Mules, E.H., Hume, A.N., 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. Trends Mol. Med. 8, 23–30.
- Seeburg, P.H., Colby, W.W., Capon, D.J., Goeddel, D.V., Levinson, A.D., 1984. Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12. Nature 312 (5989), 71–75.
- Stein, M.-P., Dong, J., Wandinger-Ness, A., 2003. Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic interventions. Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 1421–1437.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M., Parton, R.G., 1996. RAB11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. J. Cell Biol. 135 (4), 913–924.
- Wang, X., Kumar, R., Navarre, J., Casanova, J.E., Goldenring, J.R., 2000. Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by RAB11A and RAB25. J. Biol. Chem. 275 (37), 29138–29146.
- Wittmann, J.G., Rudolph, M.G., 2004. Crystal structure of Rab9 complexed to GDP reveals a dimer with an active conformation of switch II. FEBS Lett. 568 (1–3), 23–29.
- Zhang, B., Zheng, Y., 1998. Negative regulation of Rho family GTPases Cdc42 and Rac2 by homodimer formation. J. Biol. Chem. 273 (40), 25728–25733.
- Zhang, B., Gao, Y., Moon, S.Y., Zhang, Y., Zheng, Y., 2001. Oligomerization of Rac1 GTPase mediated by the carboxyl-terminal polybasic domain. J. Biol. Chem. 276 (12), 8958–8967.
- Zhu, G., Liu, J., Terzyan, S., Zhai, P., Li, G., Zhang, X.C., 2003. High resolution crystal structures of human Rab5a and five mutants with substitutions in the catalytically important phosphate-binding loop. J. Biol. Chem. 278 (4), 2452–2460.
- Zhu, G., Zhai, P., Liu, J., Terzyan, S., Li, G., Zhang, X.C., 2004. Structural basis of Rab5–Rabaptin5 interaction in endocytosis. Nat. Struct. Mol. Biol. 11 (10), 975–983.

3.2 – Resultados da cristalização da Rab21 e ensaios de termo-estabilidade

Estudos sobre estrutura e estabilidade das GTPases Rab21 e Rab11 humanas

Sandra M. N. Scapin, Beatriz G. Guimarães e Nilson I. T. Zanchin

Estudos sobre estrutura e estabilidade das GTPases Rab21 e Rab11 humanas

Sandra M. N. Scapin, Beatriz G. Guimarães e Nilson I. T. Zanchin

Centro de Biologia Molecular Estrutural - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) - Campinas, SP

RESUMO

As proteínas Rab pertencem a uma superfamília de GTPases de baixo peso molecular, cujo principal representante é o proto-oncogene Ras. Dentro deste grupo, as GTPases Rab constituem importantes reguladores dos processos de transporte entre os diversos compartimentos das células eucarióticas ao longo das vias biossintéticas, secretoras e endocíticas. Cada Rab apresenta uma função particular e, portanto, está associada à membrana de um determinado compartimento intracelular e é altamente específica para um tipo de transporte. As Rabs realizam um ciclo de ligação e hidrólise de GTP, através do qual sofrem constantes processos de ativação e desativação na célula. Cada GTPase Rab ativada é capaz de recrutar diversas proteínas efetoras para atuar em uma rota de transporte particular. Os mecanismos responsáveis pela alta especificidade dessas GTPases em relação aos seus sítios-alvo e pela capacidade de interação com moléculas efetoras variadas estão ainda pouco esclarecidos. Este fato tornase ainda mais intrigante considerando-se que as proteínas dessa família apresentam uma alta similaridade. No presente trabalho, visando a determinação da estrutura cristalográfica da Rab21, um membro ainda pouco estudado da família Rab, foram realizados ensaios de expressão, purificação e cristalização de duas formas truncadas da proteína. Em relação à forma truncada Rab21(17-211), foram obtidos cristais da proteína que difrataram até 2.90 Å de resolução. A Rab21 apresenta cinco resíduos de cisteína ao longo de sua sequência primária, excluindo-se as duas cisteínas do C-terminal que caracterizam a família Rab, enquanto a Rab11 não possui nenhum, o que nos estimulou a investigar diferenças em relação à estabilidade dessas proteínas. Foram realizados ensaios comparativos de termoestabilidade que demonstraram que a Rab11, com o aumento da temperatura, adquire um estado conformacional que é bastante termo-estável, enquanto que a Rab21 é bem mais instável e sofre agregação seguida de precipitação. Os resultados obtidos através de ensaios de fluorescência utilizando o composto Tioflavina T constituem uma primeira evidência de que essas alterações estruturais apresentadas pela Rab11 frente ao aumento da temperatura possivelmente levam a formações de agregados ordenados e ricos em estruturas beta características de fibras amilóides.

Palavras-chave: GTPases Rab; cristalografia de proteínas; estabilidade térmica; fibras amilóides.

INTRODUÇÃO

A complexa organização de uma célula eucariótica requer a existência de mecanismos de transporte bastante específicos entre as diversas organelas, a fim de garantir a manutenção da sua identidade e integridade estrutural. A família Rab, o maior grupo de proteínas ligantes de GTP da superfamília ras, exerce um papel fundamental nesse aspecto, atuando na regulação das várias etapas do transporte intracelular, como na formação de vesículas de transporte e seu correto direcionamento, ancoragem e fusão 20 compartimento de destino (Zerial e McBride, 2001; Pfeffer, 2001). Esta função está estreitamente relacionada à capacidade das Rabs realizarem um ciclo de ligação e hidrólise de GTP. Através deste ciclo, as Rabs transitam entre um estado ativo, de ligação ao GTP, onde ocorre o reconhecimento e a interação específica com moléculas efetoras, e um estado inativo, de ligação ao GDP.

Mais de 60 proteínas da família Rab já foram descritas em humanos e a maioria é ubiquamente expressa (Pereira-Leal e Seabra, 2001; Seabra et al., 2002). Além disso, GTPases Rab já foram encontradas em todos os organismos eucarióticos investigados (Bock et al., 2001). Este grande número e ampla distribuição ilustram bem a importância funcional deste grupo de proteínas. Cada Rab apresenta uma localização celular distinta e relacionada à etapa de transporte em que está envolvida (Seabra e Wasmeier, 2004; Pfeffer e Aivazian, 2004). As Rabs apresentam um alto grau de similaridade, principalmente na região ligante de nucleotídeo, sendo que a maior parte das diferenças reside no C-terminal, o que tem sido apontado como o principal determinante da localização celular diferenciada dessas GTPases (Chavrier et al., 1991), embora outras regiões também pareçam ser importantes para este processo de endereçamento (Ali et al., 2004).

A GTPase Rab21, um membro ainda pouco estudado da família Rab, foi originalmente clonada e seqüenciada a partir de uma biblioteca de células da linhagem MDCK II (*Madin-Darby canine kidney cells*) (Zerial e Huber, 1995) e, posteriormente, a partir de células humanas de epitélio intestinal da linhagem CaCo-2 (*colon* carcinoma-2) (Opdam et al., 2000). A Rab21 é ubiquamente expressa e sua localização nas células Caco-2 mostrou-se dependente da polarização celular, já que a proteína foi detectada no retículo endoplasmático de células não-polarizadas e em vesículas apicais de células polarizadas (Opdam et al., 2000). Foi, inclusive, proposto que a presença da Rab21 nessas vesículas apicais, cuja marcação se sobrepõe a regiões de endossomos tardios, indicaria uma função relacionada à da GTPase Rab11, cuja estrutura cristalográfica foi alvo de nosso estudo anterior (Scapin et al., 2006). Proteínas ortólogas da Rab21 já foram descritas em alguns organismos como Dictvostelium, Nematódeos e Drosophila, mas não em levedura (Khurana et al., 2005). Simpson et al., 2004, publicaram o primeiro estudo funcional da Rab21 em que foi demonstrado que esta GTPase está envolvida na endocitose e que a expressão de formas mutadas da proteína afetam a morfologia e a função dos endossomos. Já Khurana et al., 2005, investigando a função da proteína ortóloga da Rab21 em Dictyostelium, identificaram duas proteínas contendo domínios LIM, denominadas LimF e ChLim, que interagem entre si e com a Rab21, atuando coletivamente na regulação da fagocitose. Os autores sugerem que processos funcionalmente similares envolvendo a regulação da Rab21 possam mediar o controle da fagocitose em outras espécies.

Estudos estruturais de GTPases, bem como de seus reguladores e efetores, estão cada vez mais contribuindo para um melhor entendimento do mecanismo de ação dessas proteínas (Paduch et al., 2001). Em relação aos aspectos estruturais da Rab21, é interessante notar que esta GTPase apresenta cinco resíduos de cisteína ao longo de sua seqüência primária, excluindo-se as duas cisteínas do C-terminal que caracterizam a família Rab, o que a difere das demais Rabs e principalmente da Rab11, que não possui nenhum resíduo adicional de cisteína. Este fato pode gerar importantes diferenças em relação à estabilidade dessas proteínas.

O objetivo deste trabalho foi promover uma melhor caracterização estrutural da Rab21 humana, através da realização de ensaios de cristalização visando a resolução da sua estrutura tridimensional, e também através de um estudo comparativo de termo-estabilidade em relação à GTPase Rab11. Foram obtidos cristais da forma inativa da Rab21 que difrataram até 2.90 Å de resolução, além de dados que comprovam diferenças marcantes na estabilidade estrutural das GTPases Rab11 e Rab21.

MATERIAIS E MÉTODOS

Construção dos vetores de expressão

Para a construção do vetor pET-Rab21(17-211) a seqüência codificadora truncada (resíduos 17 a Rab21 (código 211) da humana NCBI: NM 014999.1) foi amplificada por PCR, utilizandose os oligonucleotídeos ONZ189 (5' CGG CCA TGG CCT ACT CGT TCA AGG TGG TG 3') e ONZ190 (5' CTG GGA TCC TCA TTC ATC ATC AAT AAT CTG TAC 3'), a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (Clontech). O produto de PCR foi, então, inserido entre os sítios de NcoI e BamHI do vetor pET28a (Novagen). Para a construção do vetor pET-Rab21(17-184), o cDNA codificador da porção que compreende os resíduos 17 a 184 da Rab21 foi amplificado por PCR a partir do clone pET-Rab21(17-211), com **OS** oligonucleotídeos ONZ189 e ONZ273 (5' CTG GGA TCC TCA TGC TGT TTC TAT CAT CCT TT 3'), e inserido no vetor pET28a digerido com NcoI e BamHI. O vetor pCYTEX-Rab11b já foi descrito anteriormente (Scapin et al., 2006). Para a clonagem da GTPase humana Rab11a (código NCBI: NM 004663.3), a seqüência codificadora dos resíduos 8 a 205 foi amplificada por PCR a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano e inserida no vetor pGEM-T (Promega). Os oligonucleotídeos utilizados para esta amplificação foram ONZ274 (5' GAC CAT ATG TAC GAC TAC CTC TTT AAA GTT G 3') e ONZ275 (5' TGG GGA TCC TTA AGT GGT TGG TGG AAC ATG AAT AG 3'), contendo os sítios de restrição para as enzimas NdeI e BamHI, respectivamente. Devido a presença de um sítio para NdeI no cDNA da Rab11a, sua transferência para o vetor pCYTEXP3 (Schneppe et al., 1994) foi feita clivando-se totalmente o vetor pGEM-T-Rab11a com BamHI e parcialmente com NdeI. A verificação da construção correta dos vetores foi realizada através de clivagem com enzimas de restrição e também por seqüenciamento automático de DNA, utilizando o sistema ABI PRISM 377 DNA Sequence Analyser (Applied Biosystems).

Expressão e purificação de proteínas

A expressão das GTPases Rab21 e Rab11 foi realizada, respectivamente, nas cepas BL21(DE3) e DH5a de E. coli. Para as proteínas Rab21(17-211), Rab11a e Rab11b, uma pré-cultura de células contendo os vetores de expressão foi inoculada a 3% em dois litros de meio LB contendo antibiótico. A cultura foi mantida a 30°C, sob agitação de 200 rpm, até atingir uma OD₆₀₀ entre 0.8 e 1.0. A indução foi realizada através da adição de 0.5 mM de IPTG, durante 4 horas a 30°C, no caso da cepa BL21(DE3), ou através de 2 horas de choque térmico a 42°C, no caso da cepa DH5a. Para a produção da Rab21(17-184), a indução foi feita adicionando-se ao meio de cultura 4% do seu volume de uma pré-cultura de BL21(DE3) contendo o vetor pET28a-Rab21(17-184) e 10 mM de lactose como indutor. As células foram simultaneamente crescidas e induzidas a 25°C, durante 16 horas, com agitação de 200 rpm. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (6000g, 10 minutos, 4° C) e estocadas a -20° C.

Para o preparo dos extratos, as células foram ressuspendidas em 50 ml de tampão contendo 0.5 mM de PMSF. No caso das proteínas Rab21(17-211), Rab11a e Rab11b o tampão utilizado apresentava 20 mM de Tris-HCl pH 8.5, 20 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂ e 0.1 mM de DTT. Para o extrato da Rab21(17-184) utilizou-se 15 mM de tampão fosfato pH 6.0 contendo 20 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂ e 0.5 mM DTT. Adicionou-se às suspensões celulares 50 µg/ml de lisozima e incubou-se em gelo durante 1 hora. As amostras foram posteriormente sonicadas em sonicador Branson 450 (*Branson Ultrasonics Corporation*) e os extratos coletados após duas centrifugações a 15000g durante 15 minutos, a 4°C.

A primeira etapa de purificação da Rab21(17-211) consistiu no fracionamento do extrato em coluna Q-Sepharose FF de 25ml, utilizando como tampão A o mesmo tampão usado no preparo do extrato, e tampão B contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8.5, 1 M de NaCl, 0.1 mM de DTT e 1 mM de MgCl₂. As frações contendo a Rab21 foram dialisadas em tampão A e submetidas à segunda etapa de purificação em DEAE-Sepharose de 15 ml, utilizando os mesmos tampões A e B da cromatografia anterior. Com apenas estas duas etapas obteve-se a proteína já pura, porém bastante diluída uma vez que a Rab21 não interage com a resina DEAE nas condições utilizadas, sendo coletada nas frações do *flow-through* e nas lavagens. Para concentrar a proteína, as frações da DEAE foram reunidas e aplicadas à coluna Mono Q HR 5/5.

O protocolo de purificação da Rab21(17-184) teve como primeira etapa a cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose FF de 25 ml. Utilizou-se tampão A com composição semelhante a do tampão usado no preparo do lisado, e tampão B contendo 15 mM de tampão fosfato pH 6.0, 1 M de NaCl, 1 mM de MgCl₂ e 0.5 mM de DTT. As frações contendo a proteína foram reunidas e submetidas a uma segunda etapa de purificação por troca iônica em coluna Heparina FF de 10 ml. Foram utilizados os mesmos tampões A e B da etapa anterior. A seguir, a proteína foi submetida a uma última etapa de purificação por gel-filtração em coluna Superdex 75 16/60 utilizando-se 15 mM de tampão fosfato pH 6.0 contendo 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl₂ e 0.5 mM de DTT.

As GTPases Rab11a e Rab11b foram purificadas em três etapas. Inicialmente os extratos foram fracionados em coluna DEAE-Sepharose de 45 ml, utilizando-se tampão A semelhante ao do preparo do extrato e tampão B contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8.5, 1 M de NaCl, 0.1 mM de DTT e 1 mM de MgCl₂. A seguir as amostras foram aplicadas em coluna O-Sepharose HP de 16 ml e, por fim, purificadas por gel-filtração em Superdex 75 16/60. A Rab11b e a Rab11a apresentaram diferencas em relação à interação com as colunas de troca-iônica utilizadas na purificação. Enquanto a Rab11b se ligou e foi eluída no gradiente com NaCl, a Rab11a interagiu fracamente e foi coletada nas frações do flow-through e das lavagens. Portanto, apenas as frações da Rab11b eluídas da DEAE foram dialisadas em tampão A antes de aplicadas à Q-Sepharose. Por outro lado, apenas no caso da Rab11a as frações coletadas a partir da Q-Sepharose tiveram de ser concentradas por diálise reversa com PEG 20000 até 2 ml e terem a concentração de NaCl ajustada para 150 mM antes de serem aplicadas à coluna de gel-filtração. Para todos os protocolos de purificação descritos foi utilizado o sistema ÄKTA-FPLC e colunas da GE Healthcare. A análise das cromatografias foi realizada através de SDS-PAGE em gel 13.5%.

Reação de troca de nucleotídeo de guanina

A fim de obter a forma ativa das GTPases, realizou-se uma reação para substituir a molécula de GDP, que naturalmente co-purifica ligada ao sítio ativo dessas proteínas, por um análogo não hidrolisável do GTP, no caso, o GppNHp. As proteínas foram incubadas com 5 mM de GppNHp, na presença de 5 mM de MgCl₂ e 5 unidades de fosfatase alcalina por miligrama de proteína, durante 16 a 18 horas, a temperatura ambiente, em homogenizador. Para as proteínas Rab21(17-184),

Rab11a e Rab11b, esta reação foi feita entre a segunda (Q-Sepharose) e a terceira (Superdex) etapa de purificação. Já para a Rab21(17-211), a troca de nucleotídeos foi realizada ao final do protocolo de purificação, ou seja, utilizando-se as frações eluídas da MonoQ. Após a reação de troca, assim como para as demais proteínas, a amostra da Rab21(17-211) ativada foi submetida a uma gel-filtração em coluna Superdex 75 16/60 para remover a fosfatase alcalina e o GppNHp não ligado.

Ensaios de cristalização da Rab21

Os ensaios de cristalização das duas formas truncadas da Rab21 foram realizados tanto com as proteínas inativas quanto com as ativas, através do método de difusão de vapor, a 18°C, com reagentes fornecidos pelas empresas Hampton Research, Jena Bioscience e Emerald BioStructures. As amostras da Rab21(17-211) destinadas a esses ensaios foram dialisadas em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8.5, 0.1 mM de MgCl₂, 5 mM de βmercaptoetanol e 1 mM de DTT, e concentradas até 10 mg/ml. Já os ensaios de cristalização da Rab21(17-184) foram realizados com a proteína entre 6 a 10 mg/ml, em tampão contendo 15 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.5 mM MgCl₂ e 0.5 mM de DTT. As placas de cristalização foram mantidas a 18°C e analisadas periodicamente.

Para o refinamento das condições de cristalização da Rab21(17-211) inativa foram testadas variações de 25%, 22%, 20% e 18% na concentração de PEG4000, e de 0.20 M, 0.15 M, 0.10 M ou a completa remoção do MgCl₂. Também foram testadas diferentes variações de pH: 5.4, 5.8, 6.0, 6.2 e 6.5 usando tampão 0.1 M de MES, 6.75 com 0.1 M de MOPS e 7.0, 7.25 e 7.5 com 0.1 M de Hepes. Os testes foram realizados com a proteína em duas concentrações distintas: 7 e 10 mg/ml.

Coleta, processamento dos dados e substituição molecular

Os dados de difração de cristais da Rab21(17-211)-GDP foram coletados na linha de luz de cristalografía de proteínas D03B-MX1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, utilizando o detector MAR165 CCD. A coleta foi realizada em condições criogênicas (a 100 K), utilizando-se como crioprotetor a solução-mãe contendo 20% de glicerol. O processamento dos dados de difração foi realizado utilizando os programas MOSFLM (Leslie, 1992) e SCALA (Collaborative Computational Project N°4 [CCP4], 1994). A substituição molecular foi realizada utilizando-se um modelo teórico gerado com o programa Swiss-Model (Schwede et al., 2003). O refinamento foi realizado com o programa Refmac5 (Murshudov *et al*, 1997), enquanto que a interpretação do mapa de densidade foi feita através do programa O (Jones e Kjeldgard, 1997).

Análises de desnaturação térmica por dicroísmo circular

As análises de estabilidade térmica das proteínas Rab21(17-211), Rab21(17-184), Rab11b e Rab11a, ativas e inativas, foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria do LNLS, por dicroísmo circular (CD), utilizando 0 espectropolarímetro JASCO J-810 acoplado a um controlador interno de temperatura (Peltier Type Control System PFD 425S, JASCO). As proteínas foram analisadas na concentração de 15 µM, em cubetas de 0.1 cm de caminho óptico. Os ensaios da Rab21(17-184) foram realizados em tampão contendo 15 mM Tris-HCl pH 7.2, 0.5 mM de MgCl₂ e 0.5 mM de DTT, enquanto para a Rab21(17-211), Rab11b e Rab11a utilizou-se tampão composto por 10 mM de Tris-HCl pH 8.5 e 0.1 mM de MgCl₂. Duas diferentes abordagens foram utilizadas para análise da perda de estrutura secundária em função do aumento de temperatura, em um intervalo de 10-20°C a 80-95°C. A primeira consistiu em coletar o espectro de CD na faixa de UV distante (200-260 nm), em intervalos de 5°C. A segunda foi feita monitorando-se o sinal de CD no comprimento de onda fixo em 222 nm, a cada variação de 0.5°C na temperatura. Esta segunda abordagem foi utilizada também para o ensaio de renaturação das proteínas, em um intervalo de 80-95°C a 10°C. Os dados foram adquiridos com softwares desenvolvidos pela Jasco (Temperature / Wavelength Scan, Interval Analysis, Spectra Analysis e outros). Os espectros de CD foram processados e analisados através dos Origin® CDNN programas (Microcal) e (Versão 2 Deconvolution Bioinformatik.biochemtech.uni-halle.dee/cdnn).

Ensaio de fluorescência de Tioflavina T (ThT)

Amostras das proteínas Rab11a, Rab11b e Rab21(17-211), a 15 μ M, em tampão contendo 10 mM Tris-HCl pH 8.5 e 0.1 mM de MgCl₂, foram gradualmente aquecidas em bloco térmico até 90°C e, a seguir, incubadas com 25 μ M ThT durante 10 minutos, a temperatura ambiente. As leituras do espectro de fluorescência foram realizadas excitando-se as amostras no comprimento de onda de 440 nm e medindo-se a emissão entre 460 e 600 nm,

utilizando-se cubetas de 1 cm de caminho óptico e um Fluorímetro modelo ISSK2. Para processamento dos dados e construção do gráfico foi utilizado o programa Origin[®] (Microcal).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão, purificação e cristalização da GTPase Rab21 humana

Visando a obtenção da proteína Rab21 para ensaios de cristalização, foi realizada inicialmente a análise da predição de sua estrutura secundária, através do *software* PSIPRED (Jones, 1999), em que foi verificado que a Rab21, assim como a Rab11, apresenta regiões não estruturadas no N- e no C- terminal (Fig. 1).



Figura 1: Predição da estrutura secundária da Rab21 humana. Estão indicados os sítios de deleção no N- e C-terminal da forma truncada Rab21(17-211) (setas pretas) e o sítio de deleção no Cterminal da Rab21(17-184) (seta vermelha).

Com base nessa análise e também nos dados obtidos através do alinhamento da seqüência da Rab21 com a de outras Rabs depositadas no PDB (Protein Data Bank), construiu-se o vetor pET-Rab21(17-211), para expressão dessa GTPase sem qualquer tipo de fusão, truncada nas extremidades N- e Cterminal. A proteína apresentou-se parcialmente solúvel em E. coli e um protocolo de purificação e concentração em três etapas cromatográficas foi estabelecido, obtendo-se, ao final, a proteína suficientemente pura para a realização dos ensaios de cristalização (Fig. 2A). Os testes de cristalização foram realizados tanto com a proteína inativa, ligada a GDP, quanto com a proteína ativa, ligada a GppNHp, um análogo não-hidrolisável de GTP. Observou-se a formação de cristais da Rab21(17-211)-GDP, em torno de 24 horas após a montagem das placas, na condição contendo 25% de PEG 4000, 0.1 M de MES pH 6.5 e 0.2 M de MgCl₂. Os cristais, nesta condição, formaram-se em grande número, mas em tamanho reduzido, o que indica uma nucleação muito intensa (Fig. 2B). Apesar disso, os cristais difrataram e um conjunto de dados foi coletado e processado, obtendo-se os parâmetros apresentados na Tabela 1. Os cristais pertencem ao grupo espacial C2 e a resolução máxima foi estimada em 2.90 Å. De acordo com o cálculo do coeficiente de Matthews (Matthews, 1968), existem duas moléculas de proteína por unidade assimétrica e 37.3% de solvente.

A resolução da estrutura foi realizada por substituição molecular, utilizando um modelo teórico da Rab21 gerado através do programa Swiss Model (Schwede et al., 2003), com as regiões denominadas Switch I e II deletadas. Essas regiões, características de GTPases da família Rab, são as que sofrem as maiores alterações conformacionais durante o processo de ativação e geralmente estão desordenadas nas Rabs inativas. Foram encontradas duas soluções, uma para cada molécula da unidade assimétrica, e realizado um primeiro ciclo de refinamento para obtenção do mapa de densidade eletrônica. A partir da análise deste primeiro mapa foi observada densidade eletrônica compatível com uma molécula de GDP ligada ao sítio ativo da proteína, o que é



Figura 2: Purificação e cristalização da Rab21(17-211). **A)** Análise por SDS-PAGE de frações purificadas da Rab21(17-211), após concentração em coluna MonoQ. Os números a esquerda representam o peso molecular, em kDa, das bandas do marcador. **B)** Cristais da Rab21(17-211) inativa, na condição inicial e **C)** após vários ciclos de refinamento.

um indício de que o modelo está corretamente ajustado à densidade, pelo menos nesta região. O primeiro ciclo de refinamento gerou valores altos de *Rfactor* e *Rfree* (35.2% e 48.8%, respectivamente), e a qualidade do mapa era consideravelmente ruim devido à baixa resolução, o que implicaria em uma grande dificuldade para o refinamento satisfatório da estrutura.

	Rab21
Linha de luz	LNLS D03B-MX1
Comprimento de onda (Å)	1.42700
Grupo Espacial	C2
Limites de Resolução (Å)*	51.23 - 2.90 (3.06 - 2.90)
Parâmetros de rede (Å °)	a = 102.744
	b = 38.777
	c = 98.149
	$\beta = 117.196$
Reflexões Totais	50,908
Reflexões Únicas	7,822
Multiplicidade*	6.5 (6.5)
Completeza (%)*	99.8 (99.8)
Rsym (%)*	8.2 (38.1)
Ι/σ(Ι)*	21.6 (4.3)

Tabela 1: Parâmetros da coleta e processamento dos dados de difração da Rab21.

*Os valores entre parênteses referem-se à última camada de resolução.

Além disso, as Rabs apresentam uma estrutura bastante conservada, já descrita em diversos trabalhos e, portanto, a análise da estrutura da Rab21 em uma resolução tão baixa poderia não acrescentar dados novos ao que já se conhece a respeito dos aspectos estruturais dessa família de GTPases.

Dessa forma, a fim de obtermos dados em maior resolução da Rab21 foram realizados diversos ensaios de refinamento das condições de cristalização. A baixa resolução foi inicialmente atribuída ao reduzido tamanho dos cristais em decorrência da nucleação muito intensa e a estratégia utilizada foi testar a redução da quantidade de precipitante da reação (PEG4000 e MgCl₂), bem como da concentração de proteína utilizada nos ensaios, a fim de diminuir a formação dos núcleos cristalinos. Também foram testadas variações no pH dos tampões de cristalização, em torno de 6.5, a fim de promover alterações na distribuição de cargas que propiciassem as interações entre as moléculas de proteína que compõem o cristal. Houve dificuldades técnicas na realização desses ensaios uma vez que a proteína é bastante instável, provavelmente em decorrência da oxidação dos resíduos de cisteína ao longo do tempo, levando a proteína à agregação e precipitação. Apesar disso, após vários ciclos de refinamento houve uma redução significativa da nucleação e foram obtidos maiores melhor definidos cristais e morfologicamente (Fig. 2C). Os melhores resultados foram verificados nas condições contendo 0.1 M MES pH 5.8, 20% PEG 4000 e 0.10 M a 0.15 M de MgCl₂, nos ensaios realizados com a proteína a 10 mg/ml. No entanto, não se observou melhora na difração desses cristais e a resolução continuou em torno de 3.0 Å. Portanto, apesar da melhora no aspecto morfológico, a ordem interna do cristal continuou relativamente ruim, mesmo após vários refinamentos. Após comparação com as estruturas de GTPases depositadas no PDB, verificamos que a região entre os aminoácidos 185 e 211 não aparece nas estruturas cristalográficas. Esta região poderia ser a responsável pela dificuldade em se obter cristais que difratem a alta resolução. Na estrutura cristalográfica da Rab11b inativa (Scapin et al., 2006) observou-se que não foi possível resolver a estrutura de um trecho da região C-terminal desta GTPase (resíduos 183 a 205), embora estes resíduos estivessem presentes na amostra utilizada na cristalização. Este fato indica que esta é uma região bastante móvel. Embora a região equivalente da Rab3a tenha tido sua estrutura determinada (Ostermeier e Brunger, 1999), isto pode resultar do fato desta GTPase ter sido cristalizada em complexo com um domínio da proteína efetora Rabphilin-3A, o que deve ter conferido estabilidade à região Cterminal. É importante observar também que nenhuma das demais Rabs já cristalizadas na forma livre apresenta um C-terminal tão extenso. Com base nestas observações, optou-se pela construção de um novo clone truncado da Rab21 (pET-Rab21(17-184)), para remoção da porção possivelmente desordenada do Cterminal (Fig. 1).

O protocolo de purificação estabelecido para a Rab21(17-211) não pôde ser aplicado no caso da Rab21(17-184). A nova forma truncada não interagiu bem com colunas de troca aniônica, mesmo utilizando tampões com pH superior ao utilizado para a purificação da Rab21(17-211). Verificou-se que a remoção da região C-terminal desordenada provoca uma transição no valor do pI teórico de 7.6 para 8.2. Esta alteração pode ter comprometido, portanto, a interação da proteína com as cargas positivas da resina. Dessa forma, estabeleceu-se um método novo para a purificação da Rab21(17-184), abrangendo três etapas cromatográficas, a partir do qual foi possível obter a proteína com um grau de pureza e concentração adequados para os ensaios de cristalização (Fig. 3A).

Diversas condições de cristalização foram testadas para a Rab21(17-184). Inicialmente testou-se a cristalização da proteína na condição em que foram obtidos os cristais da Rab21(17-211). Também foram testadas algumas variações em torno dessa condição inicial, mas em nenhum dos casos observou-se a formação de cristais. Foram realizados novos screenings determinação das condições para de cristalização da nova forma truncada da Rab21, tanto com a proteína inativa quanto com a ativa. Além disso, de acordo com o grau de precipitação das reações, foram testadas algumas variações na concentração de proteína, mas não foram obtidos cristais. Apesar das diversas modificações testadas, observou-se, nos ensaios, que a proteína parece sofrer uma transição rápida entre o estado solúvel e insolúvel. Dessa forma, a maior parte das reações apresentou ou muito ou nenhum precipitado, dependendo se esse ponto de transição foi atingido ou não, e isto certamente interferiu na obtenção de cristais.

Análise da estabilidade térmica das proteínas Rab21 e Rab11 por discroísmo circular

Conforme já mencionado, a GTPase Rab21, ao contrário das demais Rabs, apresenta cinco resíduos de cisteína ao longo de sua seqüência primária, adicionalmente às duas cisteínas da região C-terminal que estão presentes em todos os membros da família Rab e que são alvo de modificações pós-traducionais importantes para sua ancoragem à membrana. Este fato pode gerar diferenças na estabilidade da Rab21 comparativamente a outros membros da família Rab. Além disso, no decorrer do trabalho com as GTPases Rab11b e Rab21 ficou claro algumas diferenças em relação a estabilidade dessas proteínas. A Rab11b era obtida em alta quantidade nas frações solúveis do extrato de E. coli, mesmo em condições de indução por choque térmico a 42°C. Já a Rab21 apresentou proporcionalmente uma solubilidade bem inferior, mesmo em temperaturas de 25-30°C, e observou-se que as amostras purificadas da proteína agregavam e precipitavam ao longo do tempo. Todos esses fatores nos estimularam a diferencas investigar possíveis entre а estabilidade térmica da Rab21 e da Rab11b. Os ensaios foram realizados tanto com a Rab21(17-211) quanto com a Rab21(17-184). Além disso, para efeito de comparação, a isoforma Rab11a também foi incluída nessas análises. Para isto realizou-se inicialmente a clonagem e expressão da porção compreendida entre os resíduos 8 e 205 da Rab11a humana, que apresenta as mesmas deleções no N e C-terminal efetuadas em relação a Rab11b. A Rab11a apresentou-se parcialmente solúvel em E. coli e frações da proteína suficientemente pura foram obtidas utilizando o mesmo protocolo de purificação da Rab11b (Fig. 3B), embora a Rab11a tenha diferido consideravelmente da Rab11b em relação à interação com as resinas de troca aniônica.



Figura 3: Análise por SDS-PAGE da última etapa de purificação das proteínas Rab21(17-184) **(A)** e Rab11a **(B)**, através de gel-filtração. M: Marcador de peso molecular, em kDa.

Na figura 4 estão apresentados os resultados dos ensaios de termo-estabilidade das GTPases Rab21 e Rab11. Para todas as Rabs analisadas verificou-se que, a 20°C, o sinal de CD a 222 nm da GTPase ativa é relativamente um pouco mais intenso do que o sinal da sua forma inativa, indicando um pequeno aumento em α -hélice decorrente do processo de ativação (Fig. 4A). Este dado está de acordo com o que foi observado comparando-se as estruturas da Rab11b ligada ao GDP e ao GppNHp, onde, mediante a ativação, ocorre a estabilização dos resíduos 179-188 e, conseqüentemente, o alongamento da hélice $\alpha 5$ (Scapin et al., 2006). Além disso, a leitura inicial de CD em 222 nm forma truncada Rab21(17-184), da independentemente do seu estado de ativação, é maior do que o sinal da Rab21(17-211) (Fig. 4A). Este resultado era esperado já que a remoção de uma porção desordenada da proteína faz com que a quantidade de regiões estruturadas, em relação às não-estruturadas, se torne proporcionalmente maior. Observa-se

também que a Rab21(17-184), talvez por compreender uma estrutura mais compacta, apresenta uma estabilidade térmica maior do que a Rab21(17-211), o que se reflete na sua temperatura média de transição (Tm), próxima de 59°C, tanto para a forma ativa quanto para a inativa. Para a Rab21(17-211) este valor é próximo de 52°C para a proteína inativa e 47°C para a ativa.

Efetuando-se a deconvolução dos espectros de CD a 20°C das proteínas analisadas, observou-se que, de modo geral, as isoformas Rab11 apresentam um conteúdo cerca de 5% maior de α -hélices e 5% menor de folhas- β do que as formas truncadas da Rab21. Esta pequena diferença em quantidade de estruturas secundárias se reflete no formato dos espectros que, no caso da Rab11 apresenta mínimos bastante característicos da presença de ahélices, enquanto nos espectros da Rab21 estes mínimos não estão muito bem definidos (Fig. 4B). Comparando-se os espectros das formas truncadas da Rab21 observa-se que a Rab21(17-211) apresenta um mínimo um pouco mais deslocado para a esquerda, abaixo de 210 nm, em consequência da estrutura randômica presente na sua porção C-terminal e que está ausente na Rab21(18-184). A Rab11a, assim como a Rab11b, apresenta-se bastante estável mesmo em altas temperaturas, o que pode ser observado confrontando-se os espectros de CD coletados a 80°C dessas proteínas com os espectros da Rab21 coletados nas mesmas condições: a Rab11a e a Rab11b conservam mais da metade do sinal de CD inicial (gráficos a 20°C), enquanto o sinal da Rab21, com o aumento da temperatura, sofre uma redução bastante drástica (Fig. 4). Isto indica que, mesmo a 80°C, as duas isoformas da Rab11 ainda conservam regiões estruturadas. Já a Rab21 agrega e precipita e esta maior instabilidade pode ser em parte explicada pela presença das cinco cisteínas na estrutura primária das duas formas truncadas.

Segundo dados de modelagem utilizando o programa *Swiss-Model* (Fig. 5), estas cisteínas devem estar expostas na superfície da molécula, contribuindo para a formação de pontes dissulfeto intermoleculares e, assim, para a sua agregação e precipitação.



Figura 4: Análise de termo-estabilidade das GTPases Rab11a, Rab11b, Rab21(17-211) e Rab21(17-184), inativas (-GDP) e ativas (-GppNHp), por dicroísmo circular. **A)** Leitura do sinal de CD no comprimento de onda fixo em 222 nm, no intervalo de 10-20°C a 80-90°C. A forma truncada Rab21(17-211) sofre uma transição mais gradual para o estado agregado, em torno de 50°C, enquanto para a Rab21(17-184) esta passagem ocorre de forma mais rápida e em temperaturas próximas a 60°C. O sinal de CD das duas isoformas Rab11 se mantém relativamente alto, mesmo nas maiores temperaturas analisadas, o que indica que as proteínas continuam estruturadas nessas condições. **B)** Espectro de CD na faixa de UV distante das proteínas a 20°C e a 80°C. Ambas as formas truncadas da Rab21 sofrem completa desestabilização após aquecidas, enquanto que as duas isoformas Rab11 apresentam-se estáveis, possivelmente pela formação de agregados ordenados, ricos em estruturas-β.



Figura 5: Modelo da proteína Rab21 construído através do programa Swiss-Model. (A) Representação das estruturas secundárias: α -hélices (H) e folhas- β (B) em verde, e *loops* em amarelo. As regiões *Switch* estão destacadas (azul-claro), assim como os resíduos das extremidades N- e C-terminal. (B) Esquematização da cadeia principal, destacando as cadeias laterais dos 5 resíduos de cisteína, cujas posições estão indicadas.

É importante destacar que foram realizados ensaios de renaturação das formas inativa e ativa de todas as proteínas analisadas, mas nenhuma delas reverteu ao seu estado original.

Os gráficos das formas truncadas da Rab21 obtidos a partir da leitura do sinal de CD no comprimento de onda fixo em 222 nm em função da temperatura (Fig. 4A) apresentam um traçado sigmoidal com apenas um ponto de transição (ponto de inflexão das curvas), correspondente a Tm. Isto indica que, nos dois casos, ocorre uma passagem direta do estado solúvel para o agregado. No entanto, para a Rab21(17-211) esta passagem ocorre de forma mais gradual, principalmente para a proteína inativa, enquanto para a Rab21(17-184) esta acontece de forma bastante abrupta. independentemente do seu estado de ativação. Nesse aspecto, pode-se tracar um paralelo entre os resultados observados no ensaio de desnaturação térmica e nos testes de cristalização da Rab21(17-184). Nos dois casos, a proteína apresenta-se completamente estável e solúvel até que seja atingida uma determinada temperatura ou concentração de precipitante e, a partir desse ponto, em decorrência talvez da perda parcial de estrutura e da conseqüente exposição de regiões hidrofóbicas das moléculas, a proteína se desestabiliza, agrega e precipita.

Em relação aos gráficos da Rab11a e da Rab11b apresentados na Figura 4A, verifica-se a presença de mais de um ponto de transição, o que é um indício da ocorrência de modificações conformacionais nessas proteínas. Tanto para a Rab11a quanto para а Rab11b. independentemente do estado de ativação, existe um ponto de transição em torno de 50-55°C. É justamente nessa faixa de temperatura que se observa uma mudança no tipo do espectro dessas proteínas, que antes desse ponto apresenta um mínimo bastante acentuado em 222 nm, típico de estruturas ricas em α -hélices, e depois adquire um perfil que indica ganho em folhas-β, com mínimo em 218 nm (Fig. 4B). Esta transição das isoformas Rab11 para estruturas ricas em folhas-β e resistentes ao desenovelamento térmico gerou a hipótese de que essas proteínas poderiam converter para fibras amilóides, o que motivou a realização dos ensaios de Tioflavina T descritos a seguir.

Formação de fibras amilóides por GTPases Rab11

Existem relatos na literatura de proteínas cujas moléculas, sob condições diversas, são capazes de converter do seu estado solúvel para agregados altamente ordenados e estáveis denominados fibras amilódes (Uversky e Fink, 2004; Stefani e Dobson, 2003). Estes agregados tipicamente apresentam um alto conteúdo de estruturas-β, cujas cadeias estão dispostas perpendicularmente ao eixo da fibra (Sunde e Blake, 1997). Existem patologias humanas que se caracterizam pela formação e depósito dessas fibras amilóides nos tecidos, como é o caso de algumas doenças neurodegenerativas, incluindo o Mal de Alzheimer e a doença de Creutzfeldt-Jakob (Walsh e Selkoe, 2004). Além disso, demonstrou-se que diversas proteínas, sob condições apropriadas in vitro, são capazes de converter para este tipo de estrutura. Como exemplos podem ser citados a insulina humana (Bouchard et al, 2000), a região NM da proteína Sup35 de S. cerevisiae (Serio et al, 2000), o domínio variável LEN da cadeia leve da imunoglobulina humana (Souillac, 2003), a acilfosfatase de Sulfolobus solfataricus (Plakoutsi et al, 2004), a proteína S6 de Thermus thermophilus (Pedersen et al. 2004), a ataxina-3 humana (Chow et al, 2004) e o domínio N-terminal da proteína HypF de E. coli (Marcon et al, 2005). Técnicas utilizando Tioflavina T (ThT) podem ser empregadas para detectar conversões desse tipo, pois já foi demonstrado que a formação de fibras amilóides promove um aumento da fluorescência desse composto. Conforme sugerem os resultados obtidos através dos ensaios de estabilidade térmica das GTPases Rab11a, Rab11b e Rab21, o aumento da temperatura promove a conversão estruturas das duas primeiras а predominantemente beta enquanto que a segunda agrega e precipita. Conversões desse tipo, em decorrência da temperatura, já foram descritas na literatura, como, por exemplo, no caso da proteína monelina, isolada de plantas da espécie Dioscoreophyllum cumminsii (Konno et al, 1999). Dessa forma, a fim de verificar se a alta estabilidade e as alterações observadas nos espectros das proteínas Rab11 a partir de 50-55°C estão relacionadas à formação de fibras amilóides, realizamos uma análise de fluorescência de ThT, utilizando amostras previamente aquecidas até 90°C das GTPases Rab11a, Rab11b e Rab21. O resultado está demonstrado na Figura 6. De acordo com o esperado, observa-se que tanto a Rab11a quanto a Rab11b aquecidas promoveram o aumento da fluorescência a 485 nm, que corresponde exatamente ao comprimento de onda de emissão

do ThT. Já no caso da Rab21, utilizada como controle do experimento, esse efeito não é observado. Embora outros tipos de experimentos, como a observação das fibras através de microscopia eletrônica de transmissão ou de força atômica, sejam normalmente empregados para confirmar esse tipo de análise, o resultado obtido corrobora os dados da desnaturação térmica dessas proteínas, e apóia fortemente a hipótese de que as isoformas Rab11 convertem estruturalmente para fibras amilóides in vitro frente ao aumento da temperatura.



Figura 6: Ensaio de fluorescência do composto ThT a partir de amostras aquecidas até 90°C das GTPases Rab11 e Rab21. O espectro de emissão tanto da Rab11a quanto da Rab11b apresenta um pico a 485 nm, sugerindo a conversão estrutural para fibras amilóides. Já a Rab21 não converte para esse tipo estrutural, sendo utilizada como controle negativo do teste.

CONCLUSÕES

A GTPase Rab21 foi cristalizada no seu estado inativo e os cristais difrataram até 2.90 Å de resolução. Diversos ensaios de refinamento visando melhorar a ordem interna dos cristais foram feitos, além de tentativas de cristalizar uma nova forma truncada da proteína, mas não se obteve dados a uma melhor resolução. Foram verificadas diferenças marcantes entre a estabilidade estrutural das GTPases Rab21 e Rab11 através de ensaios de desnaturação térmica por dicroísmo circular. A Rab11 apresentou-se bastante estável, mesmo em altas temperaturas, o que está de acordo com os dados de expressão dessa proteína em que altas quantidades da Rab11 solúvel são obtidas em E. coli, mesmo a 42°C. Além disso, foi demonstrado que amostras aquecidas tanto da Rab11a quanto da Rab11b promovem um aumento na fluorescência do composto ThT, o que pode ser considerado uma primeira evidência da conversão dessas proteínas para fibras amilóides frente ao aumento da temperatura. Já a Rab21 mostrou-se bem mais instável, sofrendo agregação e precipitação ao longo do tempo, ou induzida por temperaturas superiores a 50-60°C. Esta maior instabilidade da Rab21 pode estar relacionada à presença de cisteínas na sua seqüência primária que estão susceptíveis à oxidação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, B. R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M., Seabra, M. C. 2004. Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J. Cell Sci.* 117: 6401-6412.

Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., Scheller, R. H. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409: 839-841.

Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E. J., Dobson, C. M., Robinson, C. V. 2000. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* 9: 960-967.

Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. Zerial, M. 1991. Hypervariable C-terminal domain of Rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* 353: 769-772.

Chow, M. K., Ellisdon, A. M., Cabrita, L. D., Bottomley, S. P. 2004. Polyglutamine expansion in ataxin-3 does not affect protein stability: implications for misfolding and disease. *J. Biol. Chem.* 279: 47643-47651.

Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. The *CCP4* Suite: Programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr*. D50: 760-763.

Jones, D. T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292: 195-202.

Jones, T. A. and Kjeldgard, M. 1997. Electrondensity map interpretation. *Methods in enzymology* 277: 173-208.

Khurana, T., Brzostowski, J. A., Kimmel, A. R. 2005. A Rab21/LIM-only/CH-LIM complex regulates phagocytosis via both activating and inhibitory mechanisms. *EMBO J.* 24 (13): 2254-2264.

Konno, T., Murata, K., Nagayama, K. 1999. Amyloid-like aggregates of a plant protein: a case of a sweet-tasting protein, monellin. *FEBS Letters* 454: 122-126.

Leslie, A. G. W. 1992. Joint CCP4 and ESF-EACMB. *Newsletter on Protein Crystallography*. Vol 26, Daresbury Laboratory, Warrington: UK.

Marcon, G., Plakoutsi, G., Canale, C., Relini, A., Taddei, N., Dobson, C. M., Ramponi, G., Chiti, F. 2005. Amyloid formation from HypF-N under conditions in which the protein is initially in its native state. *J. Mol. Biol.* 347: 323-335.

Matthews, B. W. 1968. Solvent content of protein crystals. J. Mol. Biol. 33 (2): 491-497.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. 1997. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst. D* 53: 240-255.

Opdam, F. J. M., Kamps, G., Croes, H., van Bokhoven, H., Ginsel, L. A., Fransen, J. A. M. 2000. Expression of Rab small GTPases in epithelial Caco-2 cells: Rab21 is an apically located GTP-binding protein in polarized intestinal epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 308-316.

Ostermeier, C. and Brunger, A. T. 1999. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of Rabphilin-3A. *Cell* 96: 363-374.

Paduch, M., Jeleń, F., Otlewski, J. 2001. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim. Pol.* 48: 829-850.

Pedersen, J. S., Christensen, G., Otzen, D. E. 2004. Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *J. Mol. Biol.* 341: 575-588.

Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C. 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313: 889-901.

Pfeffer, S. and Aivazian, D. 2004. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 886-896.

Pfeffer, S. R. 2001. Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* 11: 487-491.

Plakoutsi, G., Taddei, N., Stefani, M., Chiti, F. 2004. Aggregation of the Acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus*: the folded and partially unfolded states can both be precursors for amyloid formation. *J. Biol. Chem.* 279: 14111-14119.

Scapin, S. M. N., Carneiro, F. R. G., Alves, A. C., Medrano, F. J., Guimarães, B. G., Zanchin, N. I. T. 2006. The crystal structure of the small GTPase Rab11b reveals critical differences relative to the Rab11a isoform. *J. Struct. Biol.* 154: 260-268.

Schneppe, B., Eichner, W., McCarthy, J. E. 1994. Translational regulation of a recombinant operon containing human platelet-derived growth factor (PDGF)-encoding genes in *Escherichia coli*: genetic titration of the peptide chains of the heterodimer AB. *Gene* 143: 201-209.

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., Peitsch, M. C. 2003. SWISS-MODEL: an automated homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3381-3385.

Seabra, M. C. and Wasmeier, C. 2004. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 451-457.

Seabra, M. C., Mules, E. H., Hume, A. N. 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol. Med.* 8: 23-30.

Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J., Moslehi, J. J., Serpell, L., Arnsdorf, M. F.,

Lindquist, S. L. 2000. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289: 1317-1321.

Simpson, J. C., Griffiths, G., Wessling-Resnick, M., Fransen, J. A. M., Bennett, H., Jones, A. T. 2004. A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J. Cell Sci.* 117: 6297-6311.

Souillac, P. O., Uversky, V. N., Fink, A. L. 2003. Structural transformations of oligomeric intermediates in the fibrillation of the immunoglobulin light chain LEN. *Biochemistry* 42: 8094-8104.

Stefani, M. and Dobson, C. M. 2003. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* 81: 678-699.

Sunde, M. and Blake, C. 1997. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Advan. Protein Chem.* 50: 123-159.

Uversky, V. N. and Fink, A. L. 2004. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochem. Biophys. Acta* 1698: 131-153.

Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. 2004. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept. Letters* 11: 213-228.

Zerial, M. and Huber, L. A. 1995. Guidebook to the small GTPases. Oxford, UK: Oxford University Press.

Zerial, M. and McBride, H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2): 107-117.

3.3 – Artigo II

The human Tip41 ortholog TIPRL interacts and regulates the bZIP transcription factor MafB

Sandra M. N. Scapin, Juliana H. C. Smetana e Nilson I. T. Zanchin

The human Tip41 ortholog TIPRL interacts and regulates the bZIP transcription factor MafB

Sandra M. N. Scapin, Juliana H. C. Smetana and Nilson I. T. Zanchin

Centro de Biologia Molecular Estrutural - Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) - Campinas, SP

ABSTRACT

Tip41 was initially identified in yeast as an inhibitor of the TOR signaling pathway, which antagonizes Tap42p interaction with PP2A type phosphatases and controls cell growth in response to nutrients via different effectors. Strikingly, its human counterpart (TIPRL) was isolated as a potential MAPK activator. In this study, we have identified MafB, a member of the large Maf sub-family of bZIP transcription factor, as a TIPRL interacting partner. Maf proteins are important transcriptional regulators of cell differentiation and morphogenesis, along several distinct developmental pathways such as hematopoiesis, lens differentiation and segmentation of hindbrain. MafB interacts with TIPRL through its bZIP domain. The interaction has been confirmed by in vitro binding assays as well as by pull-down assays of the endogenous TIPRL with the recombinant bZIP domain of MafB. In electrophoretic mobility shift assays, the MafB bZIP domain showed higher affinity for the Maf recognition element (MARE) than for TIPRL. However, in HEK293 cells co-transfected with MafB and TIPRL, the expression of a reporter gene under the control of a promoter containing MARE was significantly reduced relative to control cells transfected only with MafB. TIPRL localization both to the nucleus and cytoplasm overlaps with MafB localization in the nuclear compartment in HEK293 cells. TIPRL interaction with MafB represents a new mode of MafB regulation either by binding the bZIP domain and inhibiting DNA binding or by regulating MafB phosphorylation state, serving as an adaptor for PP2A type phosphatase action.

INTRODUCTION

Tip41 (Tap42-interacting protein of 41 kDa) was first identified in yeast as a member of the TOR kinase (Target of Rapamycin) signaling pathway (1). The TOR is an evolutionary conserved kinase that regulates a wide range of cellular processes including translation initiation and elongation, ribosome and tRNA biosynthesis, transcription, actin cytoskeleton organization, amino acid and nutrient transport and cell cycle progression (2-4). In yeast, Tip41 seems to play a key role in the regulation of the TOR pathway. It has been shown that Tip41 activity is regulated by TOR phosphorylation and that Tip41 functions as an antagonist of this kinase in the pathway that controls cell growth in response to nutrients (1). In humans, the mTOR (mammalian Target of Rapamycin) signaling pathway is activated under many different conditions including during tumorigenesis (4). The function of the human Tip41 ortholog, TIPRL, (Tip41, TOR signaling pathway regulator-like) has not been investigated yet. However, it has been described as a mediator of MAP kinase activation (5), indicating that regulation of TIPRL in human is more complex than regulation of yeast Tip41. Yeast Tip41 interacts with and antagonizes Tap42 in regulating PP2A phosphatase activity (1). In order to investigate the role of TIPRL, we performed a yeast two-hybrid assay using TIPRL as bait. The most frequent prey isolated in this screen was MafB, a member of the Maf family of transcription regulators that control processes related to development, differentiation and tumorigenesis (6-7).

Mafs contain a C-terminal bZIP (basicleucine zipper) domain that interacts with specific DNA sequences and is also involved in formation of homo and heterodimers (6-7). The Maf DNA-binding sequences (MARE, Maf recognition element) are well characterized and related to TRE (phorbol 12-0are tetradecanoate-13-acetate (TPA) responsive element) and CRE (cyclic AMP responsive element) which are recognized by bZIP transcription factors of the AP-1 and CREB/ATF families (8). It has already been demonstrated that Jun and Fos, members of the AP-1 family, can form heterodimers with Mafs

and that these heterodimers recognize preferentially non-palindromic DNA sequences formed by half MARE and half TRE (8-9).

MafB belongs to the subgroup of large Mafs which, in addition to the bZIP domain, possess an N-terminal prolin/serin/threonin-rich transactivation domain. The transactivation domain is closely related to the cellular transformation mediated by Mafs (10).Overexpression of MafB and c-Maf due to translocation to the immunoglobulin locus is associated to human multiple myeloma (MM) and indicates negative prognosis (11-15). The signature related to cMaf/MafB expression in MM includes the known Maf target genes CCND2 and cell-matrix adhesion molecule ITGB7, as well as genes controlling cell shape and cell adhesion (16).

Regarding Mafs role in development, MafB deficiencies were originally reported to cause aberrant segmentation of the hindbrain and subsequent hyperactive behavior in the Kreisler mutant mouse (17). In addition, mafB homozygous mutant mice display defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth (18) as well as severe renal dysgenesis (19). In chick embryo development, MafB, LMaf/MafA and cMaf play an important role in crystallin gene regulation and lens differentiation (20, 21). In addition, MafB role in hematopoieses is well established in chick animal model, where it induces monocytic and macrophage differentiation from multipotent progenitor cells and, concomitantly represses factor Ets-1, blocking erythroid differentiation (22-23). MafB plays a role in differentiation of pancreatic endocrine cells. In adult mouse, cMaf was expressed in both alpha- and beta-cells whereas MafA and MafB showed selective expression in the beta- (producing insulin) and alpha-cells (producing glucagon), respectively, although during embryo development MafB is expressed in both cell types (24).

All these evidence indicates that MafB plays a central role in regulating a wide range of developmental processes and uncovering the regulatory mechanisms that control MafB function is essential to understand its role in the development of specific tissues and organs. In this work, the interaction TIPRL-MafB has been identified and confirmed by *in vitro* binding assays as well as by pull-down assays of the endogenous TIPRL with the recombinant bZIP domain of MafB. Furthermore, TIPRL binding region on MafB overlaps with the bZIP domain that is required for MafB interaction with DNA. In addition, co-localization with MafB to the nucleus in human embryonic kidney cells and negative regulation of a reporter gene under the control of a promoter containing MARE elements in transfected cells support a role for TIPRL in regulating MafB activity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction of expression vectors

The TIPRL cDNA (NM 152902) was PCRamplified from a human fetal brain cDNA library (Clontech HL4028AH), using oligonucleotides ONZ305 (5'-GAA TTC ATG ATC CAC GGC TTC CAG AGC-3') and ONZ303 (5'-GGA TCC TTA TTC CAC TTG TGT ACT TTT TTG-3') and cloned into the pGEM-T vector (Promega). The cDNA was subcloned into pTL1, a pBTM116 derivative, between the EcoRI and BamHI sites, and into pET-TEV, a pET28a (Novagen) derivative, between the NdeI and BamHI sites. The pTL1 vector produces an N-terminal *lexA* fusion and contains the kanamycin resistance gene to facilitate selection. pET-TEV encodes an N-terminal hexahistidine fusion and contain a TEV protease cleavage site. To construct the pmRFP-TIPRL expression vector, the TIPRL cDNA was transferred from pGEM-T-TIPRL to the EcoRI and BamHI sites of vector pDsRed-monomer-C1 (Clontech) which produces an N-terminal fusion to the monomeric mutant form of DsRed (Discosoma sp. Red Fluorescent Protein) (25).

pACT-bZIP and pACT-MafB were isolated from the yeast two-hybrid cDNA library in the screen using TIPRL as bait. pGEX-bZIP was constructed by transferring the EcoRI-XhoI fragment, encoding the 72 C-terminal residues of MafB (residues 252 to 323), from pACT-bZIP to the E. coli expression vector pGEX-5X2 (GE Healthcare). To construct the pGEX-MafB and pEGFP-MafB, the full-length MafB cDNA fused to the HA epitope was isolated from pACT-MafB with BglII and inserted into pGEX-5X2 and pEGFP-C1 (Clontech) digested with BamHI and BglII, respectively. In these vectors, MafB is expressed as an N-terminal fusion with GST and the enhanced green fluorescent protein (EGFP), respectively. pCDNA-MafB vector contains the fulllength MafB cDNA amplified by PCR using primers ONZ467 (5'-CTT CTA GAA TGG CCG CGG AGC

TGA GCA TG-3') and ONZ468 (5'-GCG GAT CCT CAC AGA AAG AAC TCG GGA GAG-3'), inserted into the *XbaI* and *BamHI* sites of pCDNA3.1(-) (Invitrogen). The reporter plasmid pMARE-SEAP was provided by Dr. H. H. Petersen (Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine, Germany). pMARE-SEAP contains three consecutive repeats of a Maf recognition element (MARE) into the pTALSEAP vector (Clontech), driving expression of the secreted human placental alkaline phosphatase (SEAP).

Yeast two-hybrid screening

The pTL1-TIPRL vector was transformed into the yeast strain L40 and tested for self-activation of the reporter genes with the pGAD424 vector (Clontech). Expression of the lexA-TIPRL fusion was verified by Western blot with anti-lexA antibody (Invitrogen). Large-scale and library-scale sequential transformations were performed using a PEG/lithium acetate mediated protocol (Matchmaker Yeast Protocols Handbook) and a human leukocyte library cloned into pACT2 vector (BD Bioscience Clontech). Positive colonies were selected on minimal medium (SD-WLH) containing 5 mM 3aminotriazol and were subjected to a second round of selection based on the activation of the reporter gene lacZ, using an X-Gal filter assay. Total DNA from positive yeast clones was transformed into E. coli strain DH5 α by electroporation and the plasmids were extracted and sequenced. The identity of MafBexpressing clones was determined using the BLAST algorithm and their interaction with TIPRL was confirmed by retransformation of the plasmids in the presence of either pTL1-TIPRL or the control plasmid pTL1-Nip7 (unspecific bait).

Mammalian cell culture and cell extract preparation

HEK293 cells were cultured in Minimal Essential Alpha Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin at 37°C under a humidified atmosphere with 5% CO₂. Cell lysates were prepared by ressuspending cells in ice cold High Salt Buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 0.5% Igepal CA-630, 5 mM EDTA) supplemented with 1X protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics), homogenizing by aspiration through a narrow gauge pipette and incubating on ice for 12 minutes. Cell debris was removed by centrifugation at 20000×g for 10 minutes at 4°C.

Protein interaction and immunoblot assays

TIPRL was co-expressed in E.coli BL21(DE3) with full-length MafB or the bZIP domain (amino acids 252 to 323) using the pET-TEV-TIPRL vector combined with pGEX-MafB or pGEX-bZIP, respectively. Protein expression was induced with 0.5 mM IPTG for four hours at 25°C. Extracts were prepared in ice cold lysis buffer (PBS containing 0.5% Igepal CA-630, 1 mM DTT, 1 mM PMSF and 1X protease inhibitor cocktail - Roche Diagnostics), and incubated with glutathione-sepharose 4B beads (GE Healthcare) for 30 to 60 minutes at 4°C. Endogenous TIPRL-bZIP pull-down assay was performed by using recombinant GST-bZIP or GST alone immobilized in glutathione-sepharose beads, which were incubated with 500 ug of HEK293 cell extract. Subsequently, the sepharose beads were washed three times with ice cold lysis buffer and the bound proteins analyzed by SDS-PAGE. To perform immunoblot analysis, SDS-PAGE fractionated protein samples were transferred onto Immobilon-P membranes (Millipore) at 80 mA for 1.5 hour using a Multiphor NovaBlot (Amersham Pharmacia) transfer system. Membranes were blocked with 5% bovine serum albumin in TBS buffer (20mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl) and probed with mouse antibodies directed against GST or with rabbit antiserum raised against TIPRL (Bethyl Laboratories). Membranes were subsequently incubated with alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G (Sigma) and visualized by using 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) as previously described (26).

Transient transfection, subcellular localization and reporter gene assay

HEK293 cells were transfected using Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations and analyzed 48-72 h post-transfection. For subcellular localization cells were experiments. fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes, permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 10 minutes and mounted in medium containing 5 µg/ml DAPI. Images were taken on a Nikon Eclipse E600 (Nikon) equipped with a CCD camera (CoolSNAP-Procf, Media Cybernetics). For reporter SEAP reporter assays, conditioned medium was harvested and SEAP activity was assayed using the EscAPE™ SEAP system (Clontech) according to the manufacturer's instructions. Transfection efficiencies were assessed by expression of green fluorescent protein (pEGFP; Clontech).

Electrophoretic mobility shift assay

Oligonucleotides ONZ418 (5' TCT AGA TGC TTA CTA AGC ATG CTT ACT AAG CAT GCT TAC TAA GCA 3') and ONZ419 (5' TCG ATG CTT AGT AAG CAT GCT TAG TAA GCA TGC TTA GTA AGC ATC TAG AGT AC 3') were annealed and radioactively labeled with T4 polynucleotide kinase and $[\gamma^{-32}P]ATP$ (GE Healthcare) to reconstitute a probe containing three consecutive repeats of a Maf recognition sequence (MARE). Protein-DNA binding assays were performed by incubating 2 pmol of purified GSTbZIP, GST and the GST-bZIP/His-TIPRL complex, with 3 ng of the labeled probe (2.1 X 10^7 cpm/µg) in 10 µl of binding buffer containing 10 mM Hepes pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 µg/µl BSA and 20% glycerol, at 30°C for 30 minutes. Assays were also performed with protein samples previously submitted to UVcross linking (254 nm, 8W) for 15 minutes. Concentration dependent assays were performed by using increasing amounts of His-TIPRL (0.66, 1.65, 3.30, 4.95 and 6.60 pmol) relative to a constant amount of GST-bZIP (2 pmol) under the conditions described above. Samples were separated in pre-12% electrophoresed non-denaturating polyacrylamide gel (acrylamide:bisacrylamide ratio of 39:1) in running buffer (20 mM Tris, 196 mM glicine and 1 mM EDTA) for 2 h at 80V.

RESULTS

Identification of MafB as a TIPRLinteracting partner

In a previous work, we have described the biophysical characterization of the human protein α 4 and of yeast Tap42 which showed similar behavior regarding structure and stability. Both proteins contain an N-terminal α -helical stable domain and an intrinsically unstructured domain in the C-terminal region (27). Evidence from studies in yeast indicates that Tip41 interacts with Tap42 and regulates PP2A type phosphatases (1). To test whether the Tip41-Tap42 interaction was conserved in humans as indicated by their structural similarities, we performed initially a prospective experiment using the yeast two-hybrid system to



Figure 1. TIPRL interacts with the bZIP transcription factor MafB in the yeast two-hybrid system. **A)** Schematic representation of the cDNA clones of MafB isolated in a yeast two-hybrid screening using human TIPRL as bait. The length of each MafB cDNA isolated is represented by bars under the scheme of the protein's primary structure. The first amino acid residue is indicated by the number in front of each bar. **B)** Test for the activation of the reporter gene *HIS3*. Clones encoding either full-length MafB or its bZIP domain were retransformed into L40 along with pTL1-TIPRL and the resulting co-transformants were tested for the ability to grow on minimal medium lacking histidine and supplemented with 10 mM of the competitive *HIS3* inhibitor 3-AT. As a negative control, each clone was also transformed into L40 containing pBTM-Nip7, which contains Nip7p as an unspecific bait. The interaction between Nip7 and Nop8 (28) was used as a positive control. All the cotransformants were able to grow on medium supplemented with histidine (left panel), but only the positive interactions (TIPRL+MafB, TIPRL+bZIP and the control Nip7+Nop8) activated the reporter gene *HIS3* (right panel). **C)** Test for the activation of the reporter gene *lacZ*. The co-transformants shown in **B** were tested for their ability to induce the expression of β -galactosidase using an X-Gal colony filter assay. This assay confirmed the result of the *HIS3* activation assay shown in **B**, which supports the specificity of the interactions.

test TIPRL interaction with $\alpha 4$. An interaction between TIPRL and $\alpha 4$ was not detected with this system and assays using recombinant GST-TIPRL immobilized on glutathione-sepahrose beads also failed to pull down $\alpha 4$ (data not shown). Identifying interacting partners is a strong starting point to determine the function of uncharacterized proteins. Therefore, we used TIPRL as bait to screen a human leukocytes cDNA library using the yeast two-hybrid system. Initially, 54 positive clones for twohybrid interactions were isolated from 4.5 x 10⁴ transformants. Surprisingly, the most frequently protein isolated in this screen, corresponding to 27% of the positive clones, was the transcription factor MafB. Subsequently, a second screen was performed in which 6.0 x 10^6 transformants were tested. 61 clones of the second screen were sequenced and, again, MafB was the most frequent protein isolated, corresponding to 17%. The MafB positive clones comprised five different cDNAs, including both the full-length cDNA and truncated cDNAs starting at amino acids 9, 143, 238 and 252 (Figure 1A). MafB is a 323 amino acid protein and these results indicate that the 72 C-terminal residues of MafB



Figure 2. Direct interaction between TIPRL and MafB. **A)** *In vitro* binding assay using recombinant proteins. His-tagged TIPRL was co-expressed in *E. coli* BL21(DE3) with GST-MafB, GST-bZIP or GST alone as a control. GST was pulled-down by binding to glutathione-sepharose beads as described under the Materials and Methods section. TIPRL was detected by immunoblot or by coomassie staining of SDS-PAGE gels. TIPRL co-purified with both the full-length and the bZIP domain of MafB. I: input; W: wash; B: bound; *: degradation products of GST-MafB. **B)** Specific interaction of the bZIP domain of MafB with HEK293 cells endogenous TIPRL. HEK293 cell extracts were incubated with either GST or GST-bZIP bound to glutathione-sepharose beads and the proteins retained by the beads, were resolved by SDS-PAGE and probed with anti-TIPRL or anti-GST antibodies. The HEK293 endogenous TIPRL was detected in association with GST-bZIP, but not with GST alone, which confirms the specificity of the interaction. Arrow-head: unspecific band.

mediate interaction with TIPRL. The bZIP domain of MafB includes residues 207-316 with the basic motif spanning from residues 238 to 264 and the leucin zipper motif from residues 266 to 287, indicating that the interaction is mediated by the leucin zipper region, and showing that the TIPRL binding region on MafB overlaps with the bZIP domain which mediates dimerization and DNA interaction. The TIPRL-MafB and TIPRL-bZIP interactions in the yeast two-hybrid system were verified by retransforming pTL1-TIPRL with pACT-MafB or pACT-bZIP into the yeast strain L40 and assaying for reporter gene activation (Figure 1B, C). An unrelated bait, Nip7p was used as negative control and did not show activation of the reporter genes, as expected. The Nip7p-Nop8p interaction (28) served as a positive control in the assay.

GST pull-down assays were used to confirm TIPRL and MafB direct interaction *in vitro*. For this assay, TIPRL was co-expressed in E. coli with either GST-MafB, GST-bZIP or GST alone. GST and GST fusion proteins were incubated with glutathione-sepharose beads, which were washed and sedimented by centrifugation. The sedimented fractions were analyzed by immunoblot using an anti-TIPRL antibody. As expected, TIPRL was found in association to GST-MafB and GST-bZIP but not with GST alone (Figure 2A), showing that TIPRL and MafB can interact directly and that the interaction is mediated by the 72 C-terminal residues of MafB. Due to the high instability of GST-MafB in E. coli and since the interaction takes place via the bZIP domain, pull down assays to test MafB interaction with HEK293 endogenous TIPRL were carried out using GSTbZIP, which was immobilized on glutathionesepharose beads and incubated with HEK293 whole cell extracts. A parallel control pull down was performed with GST alone. TIPRL was detected only in the pull-down assay containing GST-bZIP, further supporting the hypothesis

that TIPRL interaction with MafB is specific (Figure 2B).

Analysis of TIPRL and MafB subcellular localization

mRFP-TIPRL

The subcellular localization of TIPRL was determined using a red fluorescent protein Nterminally fused to TIPRL, which was expressed in HEK293 cells transfected with vector pmRFP-TIPRL.



experiment showing the superposition of EGFP-MafB and mRFP-TIPRL signals into the nucleus.

A)

Merge: mRFP-TIPRL + EGFP-MafB

Localization of MafB was performed in the same cell system using vector pEGFP-MafB. Initially, we analyzed the distribution of the fusion proteins in separate transfection experiments. The EGFP-MafB fusion showed the expected localization, restricted to the nuclear compartment (29), whereas mRFP-TIPRL localized throughout the whole cell (Figure 3A). A subsequent localization assay was performed with both mRFP-TIPRL and EGFP-MafB co-transfected in HEK293 cell. This assay showed that there is a strong overlapping of TIPRL and MafB distribution in the nuclear region, although TIPRL is not restricted to the nuclear compartment (Figure 3B). This result indicates that TIPRL might have both a nuclear function involving regulation of MafB activity and a cytoplasmic function whose targets remain to be identified.

TIPRL binds to the bZIP domain of MafB but does not outcompete MARE

Because TIPRL interacts with bZIP region of MafB which mediates its dimerization and DNA-binding, it was expected that TIPRL could interfere with MafB binding to the Maf recognition element (MARE).

In order to investigate the effect of the presence of TIPRL in MafB-MARE interaction, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were carried out using γ^{32} P-labeled synthetic MARE and the GST-bZIP construct. Addition of isolated TIPRL to *in vitro* binding assay did not affect interaction of bZIP with MARE (data not shown). However, this interaction can be inhibited in a concentration dependent manner, following physical stabilization of the TIPRL-bZIP complex by using UV-cross linking (Figure 4A). This results show that although TIPRL-binding region on MafB overlaps with the MARE-binding region, MafB affinity to MARE is stronger than to TIPRL.

TIPRL negatively regulates the transcriptional activity of MafB

activation was assessed in HEK293 cells by using the secreted alkaline phosphatase (SEAP)

as a reporter gene under the control of a MARE-

containing promoter (pMARE-SEAP).

The effect of TIPRL on MafB transcription



Figure 4: Analysis of the effect of TIPRL on DNA-binding and transcriptional activity of MafB. A) Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) showing the inhibition of MafB:MARE complex formation in the presence of TIPRL. Purified proteins (GST-bZIP, isolated or in complex with His-TIPRL, and GST alone as a control), previously submitted to UV-cross linking, were incubated for 30 minutes with 32P-labeled MARE probe, resolved by non-denaturing PAGE and visualized by autoradiography (lanes 1-3). Alternatively, a constant amount of GST-bZIP was mixed with increasing amounts of His-TIPRL (lanes 4-8), submitted to UV-cross linking and then tested for binding to labeled MARE probe. The binding of the bZIP domain of MafB to its target DNA sequence was most affected by the purified GST-bZIP/His-TIPRL complex, but it was also reduced in the presence of increasing amounts of TIPRL, showing that TIPRL exerts an inhibitory effect on MafB-MARE binding. B) *In vivo* reporter assay of MafB activity. HEK 293 cells were transiently transfected with reporter plasmid pMARE-SEAP along with the pEGFP vector as a control of transfection efficiency. The transfection mixture also included constructs encoding MafB and/or TIPRL, as indicated. MafB-dependent expression of SEAP from reporter plasmid was determined by fluorescence and corrected for transfection efficiency of pEGFP vector. TIPRL significantly reduced the MafB-induced activation of pMARE-SEAP. Data represent the average of three independent experiments and error bars indicate the standard deviation between experiments.

The level of SEAP basal expression in HEK293 cells, activated possibly by determined endogenous Mafs, was by performing a transfection experiment with plasmids pMARE-SEAP and pCDNA-TIPRL. As expected, transfection of pMARE-SEAP in combination with plasmid pCDNA-MafB resulted in activation of SEAP expression (Figure 4B) to a level that was significantly higher than the level of SEAP in the control cells transfected with plasmids pMARE-SEAP and pCDNA-TIPRL.

When pMARE-SEAP was transfected in combination with pCDNA-MafB and pCDNA-TIPRL, a significant reduction of SEAP expression was observed (Fig 4B), indicating that TIPRL can interfere with MafB activity in vivo. This result shows that, although physical stabilization of the bZIP-TIPRL complex is required to inhibit bZIP binding to MARE in vitro, in vivo the TIPRL-MafB may be stabilized by endogenous factors, blocking MafB interaction with MARE-containing promoters. Another possibility to explain the inactivation of MafB by TIPRL may involve the type 2A phosphatases which are TIPRL-interacting partners. In this case, TIPRL would function as an adaptor protein, bringing the catalytic subunit of type 2A phosphatases near MafB to facilitate its dephosphorylation causing its inactivation (Smetana and Zanchin, unpublished results). In conclusion, this experiment revealed that TIPRL is able to inhibit MafB activity in cell cultures and strongly indicate that TIPRL is a specific regulator of MafB in vivo.

DISCUSSION

Tip41 is a conserved protein that was shown to interact with Tap42 and modulate the activity of the catalytic subunit of PP2A type phosphatases (1). In yeast, the activity of Tip41 is sensitive to rapamycin treatment placing Tip41 as a protein potentially involved in the rapamycin pathway signaling that regulates cell growth and nutrient response. Studies in the yeast indicate that the TOR kinase is activated in the presence of high nitrogen supplies and promotes Tip41 phosphorylation and Tap42 binding to the phosphatase SIT4, inhibiting its activity. In conditions of short nitrogen supplies, or in situations of TOR inhibition, such as rapamycin treatment, Tip41 is activated by dephosphorylation and binds to Tap42, releasing phosphatase SIT4 (1), which the can dephosphorylates its targets such as the transcription factor GLN3 and the serine/threonin kinase NPR, involved in the utilization of secondary nitrogen sources (1). In mammals, TOR activation inhibits PP2A type phosphatase activity that displays a function homologous to yeast SIT4, leading to S6K and eIF4E-BP phosphorylation. These proteins are involved in translation repression and their phosphorylation by TOR kinase antagonizes the inhibitory activity, stimulating protein synthesis and cell growth (2). Consistently with this finding, signaling pathways that control TOR activity are frequently activated in human tumors (4).

Since Tip41 acts as an antagonist of TOR kinase activity in yeast, investigation of the human Tip41 orthlog, TIPRL, is important to understand the TOR signaling pathway in mammals. Although data on TIPRL function are not available so far, TIPRL has been isolated in a screen for proteins activating MAPKs (Mitogen-activated protein kinases) (5), which indicates that in humans it may plays a role in different signaling pathways relative to yeast. In this study, MafB was identified as a specific TIPRL-interacting protein. Both the in vitro interaction assays and the results from subcellular localization are consistent with a role for TIPRL in the regulation of MafB activity. In addition, TIPRL has shown an inhibitory effect on MafB activity in HEK293 transfected cells. The presence of TIPRL both in the nucleus and in the cytoplasm indicates that it may play different roles in the cell which are as yet not identified.

Binding of TIPRL to the bZIP domain of MafB suggested that it might affect the interaction of MafB to its target DNA sequence, MARE (*Maf Recognition Element*). This hypothesis was tested *in vitro* using an electrophoretic mobility shift assay (EMSA), which showed that the binding of the bZIP domain of MafB to its target DNA sequence MARE was reduced only when the bZIP-TIPRL was stabilized by submitting the complex to UV-cross linking. Nevertheless, HEK293 transfection assays showed that TIPRL can inhibit MafB transcription activation of a reporter gene, which strongly indicates that TIPRL may be involved in MafB regulation *in vivo*. Thus, it is possible that inhibition of MafB by TIPRL may not be due to physical obliteration of MafB DNA-binding site but due to a functional inactivation. For example, the activity of Maf transcription factors is known to be regulated by phosphorylation (30, 31) and TIPRL interacts directly with the catalytic subunit of type 2A phosphatases (Smetana and Zanchin unpublished data). Therefore, MafB interaction with TIPRL may lead to its dephosphorylation and inactivation.

MafB is a member of the family of bZIP transcription factors involved in development, differentiation and tumorigenesis (6-7). Previous studies have shown that MafB exerts a fundamental role in optic system (20, 32) and hindbrain development (17), respiratory rhythmogenesis (18), pancreatic endocrine cell differentiation (24) and hematopoiesis (22-23). In all cases, both temporal and tissular regulation is required to either activate or inhibit MafB activity. MafB was reported to associate with other transcription factors including v-Maf and Fos (33) and the homeodomain containing factors Hoxd12 and MHox/Prx1/Phox1/Pmx1 (34). This interplay of transcription factors may be required for their regular physiological roles but also may be involved in oncogenicity because both groups of transcription factors are potential oncoproteins. The MafB interaction with TIPRL has not been described in any other species so far and shows that TIPRL may be directly involved in mechanisms controlling regulation of transcription and development. Although the interaction of yeast Tip41-Tap42 is not conserved by their eukaryotic counterparts TIPRL- $\alpha 4$, TIPRL may still be involved in the regulation of PP2A type phosphatases in mammalian cells (Smetana and Zanchin unpublished results). The possibility that the TOR kinase may regulate TIPRL cannot be ruled out before testing the TIPRL activity under conditions of activation and inhibition of the TOR kinase.

In conclusion, this work shows that TIPRL constitutes an interacting partner of MafB. From the result presented in this work, it is possible to

propose that TIPRL acts directly on the regulation of MafB activity by binding to its bZIP domain region. Since MafB plays a key role in cell differentiation and development, further studies are required to clarify the processes that are affected directly by the MafB-TIPRL interaction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPESP grant 06/02083-7 and FAPESP SMolBNet (00/10266-8) and CEPID-CBME (98/14138-2) programs. S. M. N. S. and J. H. C. S. are recipients of FAPESP and CNPq pre-doctoral fellowships, respectively. We thank Adriana C. Alves and Tereza C. Lima Silva for technical support and Zildene G. Corrêa for DNA sequencing. We are also grateful to Dr. H. H. Petersen (Max-Delbrueck-Center for Molecular Medicine, Germany) for providing plasmid pMARE-SEAP.

REFERENCES

- Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K. T., Schmelzle, T., Hall, M. N. 2001. Tip41 interacts with Tap42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol. Cell* 8: 1017-1026.
- 2. Raught, B., Gingras, A. C., Sonenberg, N. 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7037-7044.
- 3. Hay, N. and Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18: 1926-45.
- Inoki, K. and Guan, K-L. 2006. Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol.* 16: 206-212.
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H., Sugano, S. 2003. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22: 3307-18.
- Blank, V. and Andrews, N. C. 1997. The Maf transcriptional factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem. Sci.* 22:437-441.

- Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M., Engel, J. D. 1997. The world according to Maf. *Nucleic Acids Res.* 25: 2953-2959.
- Kataoka, K., Noda, M., Nishizawa, M. 1994. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol. Cell Biol.* 14: 700-712.
- Kerpolla, T. K. and Curran, T. 1994. A conserved region adjacent to the basic domain is required for recognition of an extended DNA binding site by Maf/Nrl family proteins. *Oncogene* 9: 3149-3158.
- Kataoka, K., Shioda, S., Yoshitomo-Nakagawa, K., Handa, H., Nishizawa, M. 2001. Maf and Jun nuclear oncoproteins share downstream target genes for inducing cell transformation. *J. Biol. Chem.* 276: 36849-36856.
- Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J. P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., Anaissie, E., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., van Rhee, F., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie, B., Shaughnessy Jr, J. D. 2006. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108: 2020-2028.
- 12. Gabrea, A., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. 2006. Distinguishing primary and secondary translocations in multiple myeloma. *DNA Repair* 5: 1225-1233.
- Boersma-Vreugdenhil, G. R., Kuipers, J., van Stralen, E., Peeters, T., Michaux, L., Hagemeijer, A., Pearson, P. L., Clevers, H. C., Bast, B. J. E. G. 2004. The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MafB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint. *British Journal of Haematology* 126: 355-363.
- Hanamura, I., Iida, S., Akano, Y., Hayami, Y., Kato, M., Miura, K., Harada, S., Banno, S., Wakita, A., Kiyoi, H., Naoe, T., Shimizu, S., Sonta, S.I., Nitta, M., Taniwaki, M., Ueda, R. 2001. Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20(q32;q11) chromosomal translocations. *Japanese Journal* of Cancer Research 92: 638–644.

- Chesi, M., Bergsagel, P. L., Shonukan, O. O., Martelli, M. L., Brents, L. A., Chen, T., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W. M. 1998. Frequent dysregulation of the c-maf protooncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 91: 4457-4463.
- Lombardi, L., Poretti, G., Mattioli, M., Fabris, S., Agnelli, L., Bicciato, S., Kwee, I., Rinaldi, A., Ronchetti, D., Verdelli, D., Lambertenghi-Deliliers, G., Bertoni, F., Neri, A. 2007. Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease. *Genes, Chromosomes and Cancer* 46: 226-238.
- Cordes, S. P. and Barsh, G. S. 1994. The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* 79: 1025-1034.
- Blanchi, B., Kelly, L. M., Viemari, J. C., Lafon, I., Burnet, H., Bevengut, M., Tillmanns, S., Daniel, L., Graf, T., Hilaire, G., Sieweke, M. H. 2003. MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat. Neurosci.* 6: 1091-1100.
- Moriguchi, T., Hamada, M., Morito, N., Terunuma, T., Hasegawa, K., Zhang, C., Yokomizo, T., Esaki, R., Kuroda, E., Yoh, K., Kudo, T., Nagata, M., Greaves, D. R., Engel, J. D., Yamamoto, M., Takahashi, S. 2006. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 26: 5715-5727.
- 20. Yoshida T, Yasuda K. 2002. Characterization of the chicken L-Maf, MafB and c-Maf in crystallin gene regulation and lens differentiation. *Genes Cells.* 7(7):693-706.
- Reza, H. M., Urano, A., Shimada, N., Yasuda, K. 2007. Sequential and combinatorial roles of *maf* family genes define proper lens development. *Molecular Vision* 13: 18-30.
- Kelly, L. M., Englmeier, U., Lafon, I., Sieweke, M. H., Graf, T. 2000. MafB is an inducer of monocytic differentiation. *EMBO J.* 19: 1987-1997.

- 23. Sieweke, M. H., Tekotte, H., Frampton, J., Graf, T. 1996. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85: 49-60.
- Nishimura, W., Kondo, T., Salameh, T., Khattabi, I. E., Dodge, R., Bonner-Weir, S., Sharma, A. 2006. A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic β-cells. *Dev. Biol.* 293: 526-539.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 7877-7882.
- Sambrook, J., Fritsch, E. J., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Smetana, J. H. C., Oliveira, C. L. P., Jablonka, W., Pertinhez, T. A., Carneiro, F. R. G., Montero-Lomeli, M., Torriani, I., Zanchin, N. I. T. 2006. Low resolution structure of the human α4 protein (IgBP1) and studies on the stability of α4 and of its yeast ortholog Tap42. *Biochim. Biophys. Acta* 1764: 724-734.
- Zanchin, N. I. and Goldfarb, D. S. 1999. Nip7p interacts with Nop8p, an essential nucleolar protein required for 60S ribosome biogenesis and the exosome subunit Rrp43p. *Mol Cell Biol.* 19 (2): 1518-1525.

- Petersen, H. H., Hilpert, J., Jacobsen, C., Lauwers, A., Roebroek, A. J. M., Willnow, T. E. 2004. Low-density lipoprotein receptorrelated protein interacts with MafB, a regulator of hindbrain development. *FEBS Letters* 565: 23-27.
- Sii-Felice, K., Pouponnot, C., Gillet, S., Lecoin, L., Girault, J-A., Eychène, A., Felder-Schmittbuhl, M-P. 2005. MafA transcription factor is phosphorylated by p38 MAP kinase. *FEBS Letters* 579: 3547-3554.
- Sevinsky, J. R., Whalen, A. M., Ahn, N. G. 2004. Extracellular signal-regulated kinase induces the megakaryocyte GPIIb/CD41 gene through MafB/Kreisler. *Mol. Cell. Biol.* 24: 4534-4545.
- Ring, B., Cordes, S., Overbeek, P., Barsh, G. 2000. Regulation of mouse lens fiber cell development and differentiation by the Maf gene. *Development* 127: 307-317.
- 33. Kataoka, K., Fujiwara, K. T., Noda, M., Nishizawa, M. 1994. MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. *Mol. Cell Biol.* 14: 7581-7591.
- Kataoka, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Nishizawa, M. 2001. A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation and transforming activities. J. Biol. Chem. 276: 819-826.

4 – DISCUSSÃO

4.1 – Análise da estrutura cristalográfica da GTPase Rab11b humana.

4.1.1 – Alterações estruturais durante o processo de ativação.

A GTPase Rab11b, cujas estruturas cristalográfica nas formas inativa e ativa foram determinadas respectivamente a 1.55 Å e 1.95 Å de resolução, apresentou um enovelamento clássico constituído por 6 folhas- β circundadas por 5 α -hélices. Como já descrito para as demais GTPases, as maiores alterações conformacionais resultantes da transição do estado inativo para o ativo foram verificadas nas regiões *Switch I* e *II* (Fig. 1, artigo I). Na Rab11b-GDP, por exemplo, parte da região *Switch I* (resíduos 39 a 41) estava desordenada e não pôde ser definida no mapa de densidade eletrônica, enquanto que estes mesmos resíduos estão bem modelados na estrutura da Rab11b ativa. Em relação ao *Switch II*, observou-se que a forma inativa apresenta a formação de uma hélice do tipo 3₁₀ nesta região, exclusiva da isoforma Rab11b, seguida pela hélice α 2 que está reduzida em relação ao observado em outras Rabs. Durante o processo de ativação da Rab11b, observa-se que a hélice 3₁₀ desaparece, restanto apenas a α 2 (Fig. 1, artigo I). Além das alterações estruturais nos *Switch*, foi observado também um alongamento da hélice α 5 resultante do processo de ativação da Rab11b, com a estruturação dos resíduos 179 a 188 (Fig. 1, artigo I).

4.1.2 – Comparação estrutural entre as isoformas Rab11b e Rab11a

Muitas das várias proteínas da família Rab já descritas em mamíferos parecem ser produto de duplicações gênicas, dado que diversos grupos de proteínas bastante relacionadas, ou "subfamílias", cujos membros compartilham 75% a 95% de similaridade, já foram delineados dentro desta família (Bock et al., 2001). As GTPases Rab11b, Rab11a e Rab25 juntas compõem a subfamília Rab11, que está envolvida na reciclagem de proteínas dos endossomos para a membrana plasmática (Ullrich et al., 1996), no transporte polarizado em células epiteliais (Wang et al., 2000), no tráfego de moléculas da rede trans-Golgi para a membrana plasmática (Chen et al., 1998) e na fagocitose (Cox et al., 2000). A Rab25 é a que mais se diferencia das

demais, pois apresenta uma similaridade menor e é exclusiva de células epiteliais (Goldenring et al., 2001). No entanto, tanto a Rab11a quanto a Rab11b são ubiquamente expressas e compartilham mais de 90% de identidade. Além disso, ainda não foram encontradas diferenças funcionais entre essas duas isoformas. Apesar da identificação de diversas proteínas que interagem com Rab11 e que compartilham um domínio RBD (*Rab11/25 binding domain*), não foi possível detectar diferenças na afinidade dessas proteínas por uma ou outra isoforma através de análises de calorimetria (Junutula et al., 2004).

Por causa de todos esses fatores, neste trabalho realizamos o alinhamento entre as estruturas cristalográficas das formas inativa (-GDP) e ativa (-GppNHp) da GTPase Rab11b e as formas correspondentes da Rab11a, cuja estrutura foi publicada por Pasqualato et al., 2004.

4.1.2.1 – Análise estrutural das GTPases Rab11b e Rab11a inativas

Comparando-se a Rab11a e a Rab11b inativas, foram verificadas algumas importantes diferenças. A Rab11b-GDP cristalizou como um monômero, com uma molécula de GDP e um íon magnésio ligados ao seu sítio ativo. Já a Rab11a-GDP formou um dímero e sem magnésio no sítio ligante de nucleotídeo, apesar da presença de MgCl₂ na condição de cristalização. As regiões *Switch* da Rab11a estão ordenadas, um fato incomum entre as Rabs inativas, que se caracterizam pela presença de regiões *Switch* móveis e desordenadas. Na Rab11b esta peculiaridade não foi observada e, inclusive, não foi possível modelar parte do *Switch I* (resíduos 39 a 41) (Fig. 3A, artigo I). Pasqualato et al., 2004, atribuíram a ordenação das regiões *Switch* da Rab11a-GDP à presença de ligações estabilizadoras na interface do dímero, já que estas compõem aproximadamente 75% dessa interface. Além disso, em decorrência da estabilização do *Switch I* na interface do dímero, as serinas das posições 25 e 40, por exemplo, estabeleceram uma ligação direta com o fosfato- α do GDP, o que normalmente não acontece nas Rabs inativas, e isto provavelmente contribuiu para a ligação estável do nucleotídeo mesmo na ausência do magnésio (Fig. 4A, artigo I).

Pasqualato et al., 2004, também propuseram a hipótese de que a Rab11 poderia constituir um dímero funcional, principalmente porque a interface de dimerização apresenta uma área extensa (2000 Å²), na faixa dos complexos protéicos biologicamente relevantes, que é de 1600 \pm 400 Å². As regiões *Switch*, que se sabe serem elementos-chave para os contatos proteínaproteína, estão situadas na interface do dímero e, portanto, indisponíveis para interagir com moléculas reguladoras e efetoras. Isto implica que o dímero estaria necessariamente na membrana, já que de acordo com o que se conhece a respeito do ciclo GTPase, as Rabs presentes no citoplasma sempre estão associadas a algum fator, como a proteína REP ou o GDI (Fig. 1.1). De acordo com Pasqualato et al., 2004, a dimerização da Rab11 na membrana poderia constituir um mecanismo, análogo à ação do GDI no citoplasma, pelo qual um *pool* de Rab11-GDP seria mantido no seu estado inativo em um subdomínio específico da membrana. Foi observado que, no dímero, a treonina 43 de uma das moléculas interage com a glutamina 47 da outra, e especulou-se que esta interação pode ser análoga à já descrita interação entre a treonina equivalente de GTPases Rho com um aspartato do inibidor GDI (Hoffman et al., 2000).

Wittmann e Rudolph, 2004, publicaram a estrutura cristalográfica de dímeros da Rab9-GDP, com uma superficie de interação também extensa (1200 Å²), mas envolvendo o C-terminal da proteína ao invés das regiões *Switch*. Estes autores também especularam a possibilidade de um dímero funcional, principalmente porque a formação de dímeros já foi observada em GTPases da família Rho, como Cdc42, Rac2 e RhoA (Zhang e Zheng, 1998). Para Cdc42 e Rac2, inclusive, foi descrita a formação de dímeros em solução que apresentam um aumento da atividade GTPase intrínseca (Zhang e Zheng, 1998). Por outro lado, a estrutura da Rab9-GDP também foi publicada por Chen et al., 2004, e descrita como um monômero.

Tanto a forma inativa quanto a ativa da Rab11b cristalizou na forma monomérica e a possibilidade da formação de dímeros foi totalmente descartada através da análise das suas moléculas vizinhas na rede cristalina. As formas truncadas da Rab11a e da Rab11b utilizadas na resolução de suas estruturas apresentam uma seqüência de aminoácidos totalmente idêntica até o resíduo 147, o que inclui as duas regiões *Switch*. Além disso, todas as diferenças estão concentradas na porção C-terminal das proteínas que, na estrutura da Rab11a, está muito distante da interface do dímero (Fig. 3B, artigo I). Este fato demonstra que é bastante improvável que as isoformas Rab11 apresentem diferenças em suas estruturas quaternárias. Além disso, cálculos teóricos do ΔG de associação e dissociação das moléculas que compõem o dímero da Rab11a, através do programa de predição PISA, indicam uma ligação fraca dessas moléculas, apesar da extensa área de contato entre as mesmas.

Ensaios de gel-filtração a partir de amostras da Rab11b foram realizados visando detectar dímeros da proteína. Diversas condições foram testadas, inclusive a adição às amostras

de detergentes não-iônicos, como Tween e Deoxicolato, para a formação de micelas que simulassem um ambiente de membranas, mas foram detectados apenas monômeros da proteína (Fig. 4.1). Nos trabalhos publicados sobre a Rab11a e a Rab9 inativas também não se detectou dímeros em solução através de experimentos de gel-filtração (Pasqualato et al., 2004, Wittmann e Rudolph, 2004).





Figura 4.1: Ensaio de gel-filtração da proteína Rab11b. (A) Cromatograma do padrão de peso molecular. Os picos A, B, C e D correspondem, respectivamente, a eluição das proteínas marcadoras albumina (67 KDa, 66.55 min.), ovalbumina (43 KDa, 73.53 min.), quimotripsinogênio (25 KDa, 85.12 min.) e ribonucleaseA (14 KDa, 95.84 min). (B) Cromatograma da última etapa de purificação da proteína Rab11b. Os picos 1 e 2 apresentam um tempo de retenção de 74.55 e 82.05 min., respectivamente. (C) Análise por SDS-PAGE da gel-filtração da Rab11b mostrando que a proteína (seta) é eluída apenas no pico 2 sendo, portanto, monomérica. MM: Marcador de peso molecular.

Eathiraj et al., 2005, em uma análise estrutural abrangente de GTPases da família Rab, concluíram que, nas estruturas cristalográficas das Rabs inativas, as regiões *Switch* estão sempre desordenadas ou assumem uma conformação resultante de contatos cristalográficos. Com base nesta observação e em todas as análises mencionadas, acreditamos que o monômero que descrevemos para a Rab11b representa a unidade funcional da proteína e, como não existem evidências estruturais que justifiquem diferenças na estrutura quaternária das isoformas Rab11, é possível que o dímero formado pela Rab11a seja apenas cristalográfico, e não funcional.

4.1.2.2 - Análise estrutural das GTPases Rab11b e Rab11a ativas

A Rab11b ativa, assim como a Rab11a, é monomérica e apresenta o íon magnésio fortemente ligado ao sítio ativo. A superposição dessas estruturas demonstrou um alinhamento quase perfeito, o que justifica o fato da Rab11a e da Rab11b serem reconhecidas pelos mesmos efetores e apresentarem funções celulares semelhantes (Junutula et al., 2004). É interessante notar que, apesar de bastante semelhantes entre si, tanto a Rab11a quanto a Rab11b diferem das demais Rabs em relação à conformação da região Switch II nas formas ativas. Isto porque, em geral, as Rabs ativas apresentam um Switch II helicoidal, o que não acontece no caso da Rab11 (Fig. 2, artigo I). Pelo fato das regiões Switch apresentarem seqüências bastante conservadas e sofrerem as maiores modificações conformacionais mediante o processo de ativação / desativação das Rabs, inicialmente se atribuiu a essas regiões a função única de sinalizar para moléculas efetoras sobre o estado de ativação das Rabs, mas sem garantir especificidade. No entanto, evidências mais recentes demonstram que os Switch, apesar de conservados, também estão envolvidos no reconhecimento específico das Rabs por seus efetores. Já foi comprovado, por exemplo, que pequenas diferenças em alguns poucos aminoácidos dentro ou próximos ao Switch II determinam a especificidade de ligação da proteína efetora Rabenosina5 às Rabs 4 e 5 (Eathiraj et al., 2005). Portanto, é provável que as diferenças observadas entre o Switch II da Rab11 e das demais Rabs seja um fator importante para o processo de reconhecimento específico da subfamília Rab11 pelas FIPs (Family of Rab11 Interacting Proteins).

Em relação à comparação do sítio ligante de nucleotídeo das formas ativas da Rab11 (Figs. 4C, artigo I), observou-se que, diferentemente do que ocorre na Rab11b-GppNHp, a serina da posição 20 não interage com o oxigênio do fosfato-γ do análogo do GTP na Rab11a-GppNHp. Embora na superposição do sítio ativo da Rab11b-GppNHp com o da Rab11a-GTPγS tenham sido encontradas diferenças em relação às posições e interações de outras duas serinas (S40 e S42) (Fig. 4B, artigo I), isto ocorreu provavelmente pelo fato das proteínas terem sido cristalizadas ligadas a análogos de GTP distintos. Sabe-se que a serina 20 da Rab11 é um resíduo importante para o processo de hidrólise de GTP. Chen e Wandinger-Ness, 2001, demonstraram que a substituição da serina 20 por uma valina produziu um mutante da Rab11a com redução efetiva da taxa de hidrólise. Além disso, Seeburg et al., 1984 mostraram que mutações na posição equivalente à da serina 20 na GTPase *Ras* freqüentemente reduzem sua
taxa de hidrólise de GTP, levando ao aumento de sua atividade biológica e à transformação celular. Essas evidências nos estimularam a realizar ensaios *in vitro* para compararmos as taxas de ligação e hidrólise de GTP das proteínas Rab11a e Rab11b, mas não foram encontradas diferenças significativas (Fig. 4.2). É importante ressaltar que esse resultado pode não refletir o que ocorre verdadeiramente na célula, uma vez que no ambiente celular a hidrólise de GTP pelas Rabs acontece com o auxílio de proteínas reguladoras GAPs (*GTPase activation proteins*). Assim, embora as proteínas Rab11a e Rab11b apresentem uma taxa intrínseca de hidrólise de GTP semelhante, não se pode descartar a possibilidade de que essa diferença ocorra físiologicamente, através de uma interação diferenciada com GAPs.



Figura 4.2: Ensaio comparativo de hidrólise de GTP *in vitro* das proteínas Rab11a e Rab11b. O resultado está representado como um gráfico da intensidade da banda do GDP medida através do *software* de análise *Image Gauge V3* do *PhosphoImager*, em função do tempo de reação. Os valores correspondem a média de três experimentos independentes e as barras representam os desvios padrões. Observa-se que não existem diferenças significativas na atividade hidrolítica das duas isoformas.

Portanto, mais estudos são necessários para tentar esclarecer quais as diferenças funcionais entre a Rab11a e a Rab11b, ou qual a relevância biológica da presença simultânea dessas duas isoformas, tão relacionadas estrutural e funcionalmente, em células de mamíferos. Nesse aspecto, é importante ressaltar que, no decorrer deste trabalho em que tivemos a

oportunidade de realizar ensaios de expressão e purificação das duas proteínas, foram observadas diferenças significativas em relação à interação da Rabl1a e Rabl1b com colunas de troca-iônica, mesmo utilizando amostras das proteínas truncadas em posições idênticas e as mesmas condições de expressão e purificação. Sabe-se que a ligação às resinas carregadas na cromatografia líquida de adsorção ocorre em função das características da superfície das proteínas. E é este tipo de característica que constitui a base da interação entre proteínas. Portanto, embora Junutula et al., 2004, não tenham detectado diferenças na interação das isoformas Rab11 com algumas FIPs por calorimetria, é possível que a Rab11a e Rab11b sejam capazes de interagir diferencialmente com outras proteínas ainda não investigadas.

Um último aspecto que merece destaque é o fato de que, tanto no sítio ativo da Rab11a quanto no da Rab11b, a glutamina da posição 70 não interage com o fosfato- γ do GTP (Fig. 4C, artigo I). Em várias outras Rabs ativas que já tiveram sua estrutura determinada esta interação ocorre (Fig, 5, artigo I) e, inclusive, esta glutamina é bastante conservada e tem sido um alvo constante de mutações a fim de obter formas constitutivamente ativas de GTPases Rab. No caso específico da Rab11, já foi observado que o mutante Q70L apresenta uma taxa de hidrólise semelhante à da proteína selvagem (Chen e Wandinger-Ness, 2001). Um fato que comprova isto é que mutantes hidrólise-deficientes geralmente são cristalizados ligados ao GTP original, como no caso da Rab5A(A21P) (Zhu et al., 2003) (Fig. 5, artigo I), e não utilizando um análogo não-hidrolisável, como no caso da Rab11a(Q70L) que foi cristalizada complexada ao GTP γ S (Pasqualato et al., 2004) (Fig. 4B, artigo I). Portanto, nossos dados estruturais permitem explicar porque a Rab11 se diferencia das demais Rabs em relação ao papel do resíduo Q70 na hidrólise de GTP.

4.2 – Estudos estruturais e funcionais da GTPase Rab21 humana

Visando uma melhor caracterização dos aspectos estruturais das GTPases da família Rab, e também devido ao êxito obtido nos ensaios de cristalização e resolução da estrutura da Rab11b, foram realizados diversos testes de cristalização da Rab21, um membro ainda pouco descrito dentro desta família. Inclusive, no primeiro trabalho descrito em relação a Rab21 humana, de acordo com dados de localização celular na linhagem CaCo-2 (*colon carcinoma-2*), Opdam et al., 2000, propuseram que a Rab21 deveria exercer uma função relacionada à da

Rab11. No entanto, Simpson et al., 2004, demonstraram posteriormente que a Rab21 está envolvida nas etapas iniciais da endocitose e, portanto, está mais funcionalmente relacionada à GTPase Rab5.

Inicialmente foi feita a purificação e cristalização da Rab21 truncada nos resíduos 17 e 211, tanto na sua forma inativa quanto na ativa. Foram obtidos cristais da Rab21(17-211)-GDP, mas estes apresentavam um tamanho reduzido e difrataram até 2.90 Å de resolução (Fig. 2B, item 3.2). O grande número de cristais pequenos é um indício de que, naquela condição, estava ocorrendo um processo de nucleação muito intenso, ou seja, que grande parte da proteína presente na reação estava sendo comprometida na formação de núcleos de cristalização restando pouca proteína para a etapa seguinte de crescimento dos núcleos nas três dimensões para a expansão dos cristais. Diversos refinamentos da condição de cristalização foram testados visando reduzir a nucleação, com uma melhora bastante significativa no tamanho e morfologia dos cristais (Fig. 2C, item 3.2), mas sem obter um aumento correspondente na resolução. Este fato indicou que não estávamos progredindo quanto à melhora na ordem interna dos cristais, e isto foi atribuído à presença de uma região possivelmente desordenada no C-terminal da Rab21, que continuava presente mesmo truncando a proteína no resíduo 211 (Fig. 1, item 3.2). Com isso, novos ensaios de purificação e cristalização foram realizados em relação a uma nova forma da Rab21, truncada nos resíduos 17 e 184, mas não foram obtidos cristais. Embora a diferença entre as formas truncadas da Rab21 esteja restrita a 27 aminoácidos do C-terminal, estas diferiram consideravelmente na capacidade de interação com resinas de troca-iônica, sendo necessário utilizar estratégias de purificação bastante diferenciadas para cada uma delas. Além disso, ensaios comparativos de desnaturação térmica das duas formas truncadas da Rab21, monitorada por dicroísmo circular, demonstraram que, embora ambas as amostras agreguem e precipitem frente ao aquecimento, a Rab21(17-184) apresenta uma estrutura mais estável, com um acréscimo de aproximadamente 9°C na temperatura média de transição (Tm) em relação a Rab21(17-211) (Fig. 4A, item 3.2). Mesmo com um acréscimo na estabilidade, observou-se que a Rab21(17-184), por outro lado, sofre uma transição muito mais rápida do estado solúvel para o agregado do que a Rab21(17-211) (Fig. 4A, item 3.2). Este aspecto também foi observado durante os ensaios de cristalização da Rab21(17-184), em que a maior parte das reações apresentou ou muito ou nenhum precipitado, indicando uma transição rápida entre esses dois estados. Este fato, somado a tendência natural de agregação das amostras da Rab21 devido aos

cinco resíduos de cisteína presentes em sua seqüência primária, certamente interferiu na obtenção de cristais da proteína que difratassem em alta resolução.

O processamento dos dados de difração a 2.90 Å de resolução de cristais da Rab21(17-211)-GDP foi realizado, bem como a substituição molecular e um primeiro ciclo de refinamento. No entanto, foram obtidos valores altos de *Rfactor* e *Rfree* (35.2% e 48.8%, respectivamente), além de um mapa de densidade eletrônica bastante ruim em decorrência da baixa resolução, o que implicaria em uma grande dificuldade para o refinamento satisfatório da estrutura. Além disso, como as Rabs apresentam um estrutura conservada e já descrita em diversos trabalhos, a análise estrutural da Rab21 em uma resolução tão baixa provavelmente não acrescentaria dados novos ao que já se conhece a respeito dessa família de GTPases. Por fim, a estrutura cristalográfica da Rab21 foi publicada por Eathiraj et al., 2005, em um trabalho envolvendo a resolução e análise de um total de 20 estruturas cristalográficas de GTPases Rab. Para a Rab21, foram depositadas 4 diferentes estruturas: Rab21-GDP a 2.33 Å, Rab21-GppNHp a 2.50 Å e também a 2.05 Å, e Rab21(Q53G)-GppNHp a 1.80 Å. A forma truncada da Rab21 cristalizada continha a porção compreendida entre os resíduos 16 a 225, embora nas estruturas cristalográficas apenas os resíduos 21 a 182 tenham sido modelados (Eathiraj et al., 2005).

Ainda em relação a Rab21, é importante mencionar que foi feita a construção de um clone para expressão da sua forma constitutivamente ativa (mutante Q78L), que foi utilizada como isca em um ensaio de duplo-híbrido a fim de identificarmos os possíveis efetores que interagem especificamente e participam das vias de transporte intracelular em que a Rab21 está envolvida (dados não mostrados). A Rab21 foi escolhida como alvo deste estudo funcional uma vez que esta GTPase foi pouco caracterizada, diferentemente da Rab11, que apresenta diversos efetores já identificados e agrupados na família FIP. No ensaio de duplo-híbrido foram testadas duas bibliotecas de cDNA diferentes, ambas contendo a seqüência codificadora da Rab21, obtendo-se, nos dois casos, uma alta eficiência de transformação da cepa de levedura utilizada no ensaio. No entanto, não foi possível isolar nenhum clone positivo para a expressão do gene repórter *HIS3* e isto pode ter ocorrido porque a fusão lexA-Rab21Q78L talvez não seja funcional.

4.3 – Termo-estabilidade e formação de estruturas-β por GTPases Rab11

Diferentemente do que foi observado em relação a Rab21, tanto a Rab11a quanto a Rab11b mostraram-se bastante estáveis nos experimentos de desnaturação térmica por dicroísmo circular. Foi observado que as GTPases Rab11 conservaram mais da metade do sinal inicial de CD, mesmo a 80°C, o que indica que as proteínas se mantêm estruturadas em altas temperaturas (Fig. 4, item 3.2). Estes dados estão de acordo com as diferenças observadas entre a estabilidade das GTPases Rab11 e Rab21 no decorrer dos ensaios de expressão em *E. coli*, em que obtinha-se grandes quantidades de Rab11 solúvel a 42°C, enquanto o rendimento da Rab21 era bem inferior, mesmo a 25-30°C.

Os gráficos das medidas do sinal de CD a 222 nm em função da temperatura das GTPases Rab11 apresentaram alguns pontos de transição, que indicam que ocorreram modificações conformacionais nessas proteínas ao longo do ensaio (Fig. 4A, item 3.2). Destes pontos, o mais evidente está na faixa dos 50-55°C, onde justamente observou-se uma mudança no tipo do espectro dessas proteínas que antes apresentavam mínimos em 208 e 222 nm, típico de estruturas com predomínio de α -hélices, e depois adquiriram um perfil de estruturas- β , com mínimo em 218 nm (Fig. 4B, item 3.2). Este tipo de alteração estrutural associada à forte resistência a desnaturação gerou a hipótese de que a Rab11b e a Rab11a poderiam estar convertendo para estruturas chamadas fibras amilóides.

As fibras amilóides são agregados protéicos altamente ordenados e estáveis, que se caracterizam por um alto conteúdo de estruturas- β (Uversky e Fink, 2004; Stefani e Dobson, 2003, Sunde e Blake, 1997). Estudos demonstram que muitas proteínas ou domínios protéicos podem, sob condições adequadas, desencadear a formação de fibras amilóides. A insulina humana (Bouchard et al, 2000), a região NM da proteína Sup35 de *S. cerevisiae* (Serio et al, 2000), o domínio variável LEN da cadeia leve da imunoglobulina humana (Souillac, 2003), a acilfosfatase de *Sulfolobus solfataricus* (Plakoutsi et al, 2004), a proteína S6 de *Thermus thermophilus* (Pedersen et al, 2004), a ataxina-3 humana (Chow et al, 2004) e o domínio N-terminal da proteína HypF de *E. coli* (Marcon et al, 2005) são alguns exemplos encontrados na literatura. Além disso, a formação de fibras amilóides também pode ocorrer fisiologicamente, e, inclusive, o acúmulo dessas fibras nos tecidos está associado a algumas patologias humanas como o Mal de Alzheimer e a doença de Creutzfeldt-Jakob (Walsh e Selkoe, 2004). O composto

Tioflavina T (ThT) tem sido bastante utilizado para a detecção de fibras amilóides, uma vez que sua emissão de fluorescência, cujo pico é em 485 nm, aumenta consideravelmente na presença dessas fibras.

Neste trabalho, foi demonstrado que amostras aquecidas a 90°C das GTPases Rab11a e Rab11b são capazes de ligar ThT e ocasionar um aumento significativo na emissão de fluorescência a 485 nm, enquanto o experimento controle com a Rab21 não produz o mesmo efeito (Fig. 6, item 3.2). A formação de fibras amilóides em função do aumento de temperatura já foi descrita na literatura como, por exemplo, no caso da proteína monelina, isolada de plantas da espécie *Dioscoreophyllum cumminsii* (Konno et al, 1999). Embora outras abordagens experimentais sejam normalmente utilizadas, em conjunto com a técnica do ThT, a fim de validar este tipo de análise, este resultado é uma primeira e forte evidência de que as isoformas Rab11 convertem estruturalmente para fibras amilóides *in vitro* frente ao aumento da temperatura. Além disso, essas análises demonstram que pequenas diferenças na estrutura primária de proteínas bastante relacionadas, como as GTPases Rab11 e Rab21 que conservam uma estrutura terciária que é comum a todos os membros da família Rab, podem afetar consideravelmente aspectos relacionados à estabilidade das mesmas.

4.4 – Análise da interação entre as proteínas TIPRL e MafB

A Tip41 é uma proteína conservada que parece estar envolvida em vários processoschave de sinalização celular, embora seu papel funcional não esteja bem esclarecido. Esta proteína foi identificada em levedura como participante da via de sinalização sensível a rapamicina mediada pela quinase TOR, que envolve também a proteína Tap42 e a fosfatase SIT4, e que regula o crescimento celular em resposta a presença de nutrientes. Em mamíferos, é provável que exista uma via de regulação do crescimento celular parecida, pois já foi demonstrada a interação entre as proteínas Alpha-4 e PP2A (homólogas da Tap42 e da fosfatase SIT4, respectivamente), bem como a inibição da PP2A pela TOR, assim como ocorre em levedura. No entanto, o papel funcional da homóloga da Tip41 (TIPRL) nesta via ainda precisa ser esclarecido (Smetana e Zanchin, trabalho em andamento). Por outro lado, a TIPRL foi identificada como uma possível ativadora de MAP quinases (Matsuda et al., 2003), o que sugere que esta proteína deve participar de outras vias de sinalização em mamíferos.

Em um trabalho paralelo, J. Smetana confirmou a interação da TIPRL com as fosfatases tipo 2A. No presente trabalho, identificamos a proteína MafB como um novo alvo molecular da TIPRL. Esta interação foi confirmada no sistema de duplo-híbrido e através de ensaios de ligação *in vitro* mostrando que (i) as proteínas recombinantes são co-expressas e co-purificadas em *E. coli*; (ii) a TIPRL endógena de células HEK293 (Graham et al., 1977) se liga ao domínio bZIP da MafB (Figs. 1-2, artigo II). Dessa forma foi possível reunir um conjunto de dados que comprovam a interação entre essas proteínas. Além disso, a análise da localização celular da TIPRL revelou que a proteína apresenta-se dispersa pela célula e que sua localização se soprepõe com a da MafB no compartimento nuclear (Fig. 3, artigo II). Este resultado nos leva a crer que a TIPRL pode exercer diferentes funções na célula, tanto no núcleo, onde a MafB é um dos seus alvos moleculares, quanto no citoplasma.

A MafB é um membro da família Maf de fatores de transcrição que contêm um domínio bZIP e estão envolvidos em processos de desenvolvimento, diferenciação e tumorigênese (Blank e Andrews, 1997, Motohashi et al., 1997). Estudos anteriores mostram que a MafB exerce um papel fundamental no desenvolvimento do sistema óptico (Yoshida e Yasuda, 2002, Reza et al., 2007, Ring et al., 2000), do rombencéfalo (Cordes e Barsh, 1994), na ritmogênese respiratória (Blanchi et al., 2003) e também na hematopoese (Kelly et al., 2000, Sieweke et al., 1996). Sua

interação com a TIPRL não havia sido identificada, até o momento, em nenhuma outra espécie e mostra que a TIPRL pode estar diretamente envolvida em mecanismos de controle da transcrição e regulação do desenvolvimento.

Devido ao fato da proteína TIPRL interagir com o domínio bZIP da MafB, inicialmente caracterizado como um domínio de ligação ao DNA, esperava-se que esta interação pudesse interferir no reconhecimento e ligação da MafB ao seu DNA-alvo denominado MARE (Mafrecognition element). A fim de esclarecer esse aspecto, foi realizado um ensaio de gel-shift utilizando-se a sequência MARE marcada radioativamente com γ^{32} P e as proteínas de fusão GST-bZIP e His-TIPRL, expressas em conjunto ou isoladamente em E. coli. No entanto, os resultados mostraram que o domínio bZIP só é efetivamente impedido de ligar ao DNA-alvo mediante a estabilização do seu complexo com a proteína TIPRL através de UV-cross linking (Fig. 4A, artigo II). Por outro lado, os resultados preliminares de experimentos em células HEK293 (Graham et al., 1977) contendo um sistema repórter ativado por Mafs indicam que a TIPRL é capaz de inibir a atividade transcricional de MafB in vivo (Fig. 4B, artigo II). Este resultado poderia ser facilmente explicado caso a TIPRL impedisse a ligação da MafB ao DNA. No entanto, pelo resultado das análises de *gel-shift*, parece que a simples interação entre as duas proteínas isoladas não é suficiente para produzir este efeito. Portanto, é provável que outros fatores contribuam para estabilizar o complexo TIPRL-MafB in vivo, ou, ainda, que a inibição da MafB pela TIPRL não aconteça pelo impedimento físico da sua ligação ao DNA e sim por uma desativação funcional. Sabe-se, por exemplo, que a atividade das Mafs é regulada por fosforilação (Sii-Felice et al., 2005, Sevinsky et al., 2004) e que a TIPRL interage com a fosfatase PP2A (Smetana e Zanchin, trabalho em andamento). Portanto, é possível que, através da sua interação com a TIPRL, a MafB sofra desfosforilação e, conseqüentemente, inativação, daí os resultados observados no teste in vivo. No entanto, mais experimentos são necessários para testar esta hipótese. Um outro aspecto interessante a ser investigado seria os processos celulares regulados por MafB e TIPRL ou, ainda, quais estímulos celulares promovem a interação TIPRL-MafB. Existe a possibilidade que a TIPRL constitua um elo entre a via de sinalização de MAP quinases ou, ainda, entre a via de sinalização da quinase TOR, e a regulação transcricional através de MafB, o que é perfeitamente plausível uma vez que, conforme já mencionado, a atividade das Mafs é sensível à fosforilação.

Em resumo, neste trabalho nós mostramos que a TIPRL pode constituir um novo regulador do fator de transcrição MafB, ou através da sua ligação estável ao domínio bZIP e inibição da ligação MafB-DNA, ou pela regulação do estado de fosforilação da MafB, atuando como um adaptador para a ação da fosfatase PP2A. Através dos nossos resultados aqui apresentados é possível estabelecermos uma hipótese de que a TIPRL atua em conjunto com a MafB em processos de regulação da expressão gênica. Dado que ambas as proteínas estão envolvidas em mecanismos-chave de controle do crescimento e diferenciação celular, futuros estudos acerca da elucidação da via de sinalização envolvendo a MafB e a Tip41 podem trazer importantes contribuições para um melhor entendimento dos processos de regulação do crescimento celular. Futuros estudos envolvendo a análise em larga escala do perfil de expressão gênica de células *knock-out* ou superexpressando a TIPRL são de grande interesse, a fim de esclarecer a função desta proteína como regulador da expressão gênica.

5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente projeto abordou dois diferentes aspectos de proteínas envolvidas em sinalização, um deles relacionado à análise estrutural de GTPases da família Rab, e o outro acerca da investigação do mecanismo de regulação do fator MafB pela proteína TIPRL. As principais conclusões a que chegamos a partir deste trabalho estão listadas abaixo. É importante ressaltar que os resultados obtidos criam interessantes perspectivas para novos estudos.

- ✓ A resolução da estrutura tridimensional da GTPase Rab11b nas suas formas inativa e ativa revelou um enovelamento clássico, bastante semelhante ao de outros membros da família Rab, constituído por 6 folhas-β circundadas por 5 α-hélices. As maiores alterações conformacionais resultantes da transição do estado inativo para o ativo são verificadas nas regiões denominadas *Switch I* e *II*.
- ✓ Confrontando-se a estrutura da Rab11b inativa com a da Rab11a publicada por Paqualato et al., 2004, foram verificadas importantes diferenças. A Rab11b-GDP, ao contrário da Rab11a-GDP, cristalizou como um monômero contendo magnésio no sítio ativo. Análises por gel-filtração detectam apenas monômeros para ambas as isoformas. Portanto, nossos dados contradizem a hipótese proposta inicialmente por Pasqualato et al., 2004, sobre a dimerização como um mecanismo de regulação da atividade da Rab11.
- ✓ A comparação estrutural da Rab11b e da Rab11a ativas demonstrou que estas divergem em relação à posição e à interação da serina 20 que, de acordo com dados da literatura, apresenta um papel importante na hidrólise de GTP. No entanto, a análise da taxa de ligação e hidrólise de GTP dessas proteínas não revelou diferenças significativas nesse aspecto. Existe ainda a possibilidade de que essa diferença ocorra fisiologicamente, através de uma interação diferenciada com proteínas reguladoras. Assim, mais estudos são necessários para se esclarecer se existem diferenças funcionais entre essas duas proteínas.

- ✓ As GTPases Rab21 e Rab11, apesar de pertencerem a mesma família, diferem consideravelmente em relação a estabilidade estrutural: enquanto a Rab21 agrega e precipita com o aumento da temperatura, as isoformas Rab11b e Rab11a parecem adquirir um enovelamento bastante termo-estável e rico em estruturas beta. A maior instabilidade da Rab21 pode estar relacionada à presença de cisteínas na superfície da molécula que estão susceptíveis à oxidação, contribuindo para a agregação e precipitação da proteína. Já a conversão estrutural da Rab11 frente ao aumento da temperatura parece levar a formação de fibras amilóides, conforme sugerem os resultados do ensaio de fluorescência com o composto ThT, embora mais estudos sejam necessários para comprovar esta hipótese.
- ✓ A interação direta entre a proteína TIPRL e o fator de transcrição MafB foi comprovada através de diferentes ensaios. Esta interação não havia sido identificada, até o momento, em nenhuma outra espécie e mostra que a TIPRL pode estar diretamente envolvida em mecanismos de controle da transcrição.
- ✓ A análise da localização celular da TIPRL revelou que a proteína apresenta-se dispersa pela célula e que sua marcação se sobrepõe com a da MafB no compartimento nuclear. Este resultado nos leva a crer que a TIPRL pode exercer diferentes funções na célula, tanto no núcleo, onde a MafB é um dos seus alvos moleculares, quanto no citoplasma.
- ✓ A TIPRL apenas interfere na ligação *in vitro* do domínio bZIP da MafB ao seu DNAalvo (MARE) quando o complexo TIPRL-bZIP é estabilizado por *UV-cross linking*, mas nossos resultados preliminares mostram que a TIPRL inibe a atividade transcricional da MafB *in vivo*. Portanto, a TIPRL pode constituir um novo regulador da atividade da MafB. Novos trabalhos poderão esclarecer quais vias de sinalização celular são diretamente afetadas pela interação TIPRL-MafB.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ali, B. R., Wasmeier, C., Lamoreux, L., Strom, M., Seabra, M. C. 2004. Multiple regions contribute to membrane targeting of Rab GTPases. *J. Cell Sci.* 117: 6401-6412.

Bakri, Y., Sarrazin, S., Mayer, U. P., Tilmanns, S., Nerlov, C., Boned, A., Sieweke, M. H. 2005. Balance of MafB and PU.1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. *Blood* 105: 2707-2716.

Benli, M., Doring, F., Robinson, D. G., Yang, X. and Gallwitz, D. 1996. Two GTPase isoforms, Ypt31p and Ypt32p, are essential for Golgi function in yeast. *EMBO J.* 15: 6460-6475.

Blanchi, B., Kelly, L. M., Viemari, J. C., Lafon, I., Burnet, H., Bevengut, M., Tillmanns, S., Daniel, L., Graf, T., Hilaire, G., Sieweke, M. H. 2003. MafB deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth. *Nat. Neurosci.* 6: 1091-1100.

Blank, V. and Andrews, N. C. 1997. The Maf transcriptional factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem. Sci.* 22:437-441.

Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., Scheller, R. H. 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409: 839-841.

Boersma-Vreugdenhil, G. R., Kuipers, J., van Stralen, E., Peeters, T., Michaux, L., Hagemeijer, A., Pearson, P. L., Clevers, H. C., Bast, B. J. E. G. 2004. The recurrent translocation t(14;20)(q32;q12) in multiple myeloma results in aberrant expression of MafB: a molecular and genetic analysis of the chromosomal breakpoint. *British Journal of Haematology* 126: 355-363.

Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E. J., Dobson, C. M., Robinson, C. V. 2000. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Sci.* 9: 960-967.

Chattopadhyay, D., Langsley, G., Carson, M., Recacha, R., DeLucas, L., Smith, C. 2000. Structure of the nucleotide-binding domain of *Plasmodium falciparum* Rab6 in the GDP-bound form. *Acta Crystallogr*. D56: 937-944.

Chavrier, P., Gorvel, J. P., Stelzer, E., Simons, K., Gruenberg, J. Zerial, M. 1991. Hypervariable C-terminal domain of Rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* 353: 769-772.

Chavrier, P., Parton, R. G., Hauri, H. P., Simons, K. and Zerial, M. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell* 62: 317-329.

Chen, J., Peterson, R. T. and Schreiber, S. L. 1998. Alpha 4 associates with protein phosphatases 2A, 4 and 6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 827-832.

Chen, L., Digiammarino, E., Zhou, X. E., Wang, Y., Toh, D., Hodge, T. W., Meehan, E. J. 2004. High Resolution Crystal structure of human Rab9 GTPase: a novel antiviral drug target. *J.Biol.Chem.* 279 (38): 40204-40208.

Chen, W. and Wandinger-Ness, A. 2001. Expression and functional analyses of Rab8 and Rab11A in exocytic transport from trans-Golgi network. In: Regulators and effectors of small GTPases. *Methods in Enzymology* 329: 165-175.

Chen, W., Feng, Y., Chen, D., Wandinger-Ness, A. 1998. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell* 9 (11): 3241-3257.

Chesi, M., Bergsagel, P. L., Shonukan, O. O., Martelli, M. L., Brents, L. A., Chen, T., Schrock, E., Ried, T., Kuehl, W. M. 1998. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 91: 4457-4463.

Chow, M. K., Ellisdon, A. M., Cabrita, L. D., Bottomley, S. P. 2004. Polyglutamine expansion in ataxin-3 does not affect protein stability: implications for misfolding and disease. *J. Biol. Chem.* 279: 47643-47651.

Cordes, S. P. and Barsh, G. S. 1994. The mouse segmentation gene *kr* encodes a novel basic domain-leucine zipper transcription factor. *Cell* 79: 1025-1034.

Cox, D., Lee, D. J., Dale, B. M., Calafat, J., Greenberg, S. 2000. A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 680-685.

Cullis, D. N., Philip, B., Baleja, J. D., Feig, L. A. 2002. Rab11-FIP2, an adaptor protein connecting cellular components involved in internalization and recycling of epidermal growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 277: 49158-49166.

D'Adamo, P., Menegon, A., Lo Nigro, C., Grasso, M., Gulisano, M., Tamanini, F., Bienvenu, T., Gedeon, A. K., Oostra, B., Wu, S. K., Tandon, A., Valtorta, F., Balch, W. E., Chelly, J., Toniolo, D. 1998. Mutations in GDII are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat. Genet.* 19: 134-139.

Deol, M. S. 1964. The abnormalities of the inner ear in *kreisler* mice. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 12: 475-490.

Dlakic, M. Grinberg, A. V., Leonard, D. A., Kerppola, T. K. 2001. DNA sequence-dependent folding determines the divergence in binding specificities between Maf and other bZIP proteins. *EMBO J.* 20: 828-840.

Dumas, J. J., Zhu, Z. Y., Connolly, J. L., Lambright, D. G. 1999. Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure Fold Des.* 7: 413-423.

Eathiraj, S., Pan, X., Ritacco, C., Lambright, D. G. 2005. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* 436: 415-419.

Eichmann, A., Grapin-Botton, A., Kelly, L., Graf, T., Le Douarin, M. and Sieweke, M. 1997. The expression pattern of the *mafB/kr* gene in birds and mice reveals that the *kreisler* phenotype does not represent a null mutant. *Mech. Dev.* 65: 111-122.

Eitzen, G., Will, E., Gallwitz, D., Haas, A. and Wickner, W. 2000. Sequential action of two GTPases to promote vacuole docking and fusion. *EMBO J.* 19: 6713-6720.

Esters, H., Alexandrov, K., Constantinescu, A-T., Goody, R. S., Scheidig, A. J. 2000. Highresolution crystal structure of the *S. cerevisiae* Ypt51(Δ C15)-GppNHp, a small GTP-binding protein involved in the regulation of endocytosis. *J. Mol. Biol.* 298: 111-121.

Frohman, M. A., Martin, G. R., Cordes, S. P., Halamek, L. P. and Barsh, G. S. 1993. Altered rhombomere-specific gene expression and hyoid bone differentiation in the mouse segmentation mutant, *kreisler* (*kr*). *Development* 117: 925-936.

Gabrea, A., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. 2006. Distinguishing primary and secondary translocations in multiple myeloma. *DNA Repair* 5: 1225-1233.

Goldenring, J. R., Aron, L. M., Lapierre, L. A., Navarre, J., Casanova, J. E. 2001. Expression and properties of Rab25 in polarized Mardin-Darby canine kidney cells. *Methods Enzymol.* 329: 225-234.

Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C., Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36: 59-74.

Grosshans, B. L., Ortiz, D., Novick, P. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 103: 11821-11827.

Hanamura, I., Iida, S., Akano, Y., Hayami, Y., Kato, M., Miura, K., Harada, S., Banno, S., Wakita, A., Kiyoi, H., Naoe, T., Shimizu, S., Sonta, S.I., Nitta, M., Taniwaki, M., Ueda, R. 2001. Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20(q32;q11) chromosomal translocations. *Japanese Journal of Cancer Research* 92: 638–644.

Hashizume, H., Hamalainen, H., Sun, Q., Sucharczuk, A., Lahesmaa, R. 2003. Downregulation of mafB expression in T-Helper cells during early differentiation *in vitro*. *Scandinavian J*. *Immunol*. 57: 28-34.

Hay, N. and Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18: 1926–1945.

Hickson, G. R. X., Matheson, J., Riggs, B., Maier, V. H., Fielding, A. B., Prekeris, R., Sullivan, W., Barr, F. A., Gould, G. W. 2003. Arfophilins are dual Arf/Rab11 binding proteins that regulate recycling endosome distribution and are related to Drosophila nuclear fallout. *Mol. Biol. Cell* 14 (7): 2908-2920.

Hoffman, G. R., Nassar, N., Cerione, R. A. 2000. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* 100: 345-356.

Hume, A. N., Collinson, L. M., Rapak, A., Gomes, A. Q., Hopkins, C. R., Seabra, M. C. 2001. Rab27a regulates the peripheral distribution of melanosomes in melanocytes. *J. Cell Biol.* 152: 795-808.

Inoki, K. and Guan, K. L. 2006. Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol.* 16: 206-212.

Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K. T., Schmelzle, T., Hall, M. N. 2001. Tip41 interacts with Tap42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol. Cell* 8: 1017-1026.

Jedd, G., Mulholland, J. and Segev, N. 1997. Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* 137: 563-580.

Jiang, Y. and Broach, J. R. 1999. TOR proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate TAP42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* 18: 2782-2792.

Junutula, J. R., Schonteich, E., Wilson, G. M., Peden, A. A., Scheller, R. H., Prekeris, R. 2004. Molecular characterization of Rab11 interactions with the members of family of Rab11-interacting proteins (FIPs). *J. Biol. Chem.* 279 (32): 33430-33437.

Kataoka, K., Han, S. I., Shioda, S., Hirai, M., Nishizawa, M., Handa, H. 2002. MafA is glucoseregulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J. Biol. Chem.* 277: 49903-49910.

Kataoka, K., Noda, M., Nishizawa, M. 1994. Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol. Cell Biol.* 14: 700-712.

Kelly, L. M., Englmeier, U., Lafon, I., Sieweke, M. H., Graf, T. 2000. MafB is an inducer of monocytic differentiation. *EMBO J.* 19: 1987-1997.

Kerpolla, T. K. and Curran, T. 1994. A conserved region adjacent to the basic domain is required for recognition of an extended DNA binding site by Maf/Nrl family proteins. *Oncogene* 9: 3149-3158.

Kim, J. I., Ho, I. C., Grusby, M. J., Glimcher, L. H. 1999. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10: 745-751.

Konno, T., Murata, K., Nagayama, K. 1999. Amyloid-like aggregates of a plant protein: a case of a sweet-tasting protein, monellin. *FEBS Lett.* 454: 122-126.

Kurschner, C. and Morgan, J. I. 1995. The maf proto-oncogene stimulates transcription from multiple sites in a promoter that directs Purkinje neuron-specific gene expression. *Mol Cell Biol.* 15: 246-254.

Lapierre, L. A., Kumar, R., Hales, C. M., Navarre, J., Bhartur, S. G., Burnette, J. O., Provance, D. W., Mercer-Jr, J. A., Bahler, M., Goldenring, J. R. 2001. Myosin vb is associated with plasma membrane recycling systems. *Mol. Biol. Cell* 12: 1843-1857.

Lindsay, A. J., Hendrick, A. G., Cantalupo, G., Senic-Matuglia, F., Goud, B., Bucci, C., McCaffrey, M. W. 2002. Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. *J. Biol. Chem.* 277: 12190-12199.

Lombardi, L., Poretti, G., Mattioli, M., Fabris, S., Agnelli, L., Bicciato, S., Kwee, I., Rinaldi, A., Ronchetti, D., Verdelli, D., Lambertenghi-Deliliers, G., Bertoni, F., Neri, A. 2007. Molecular characterization of human multiple myeloma cell lines by integrative genomics: insights into the biology of the disease. *Genes, Chromosomes and Cancer* 46: 226-238.

Manzanares, M., Cordes, S., Ariza-McNaughton, L., Sadl, V., Maruthainar, K., Barsh, G., Krumlauf, R. 1999. Conserved and distinct roles of *kreisler* in regulation of the paralogous Hoxa3 and Hoxb3 genes. *Development* 126: 759-769.

Marcon, G., Plakoutsi, G., Canale, C., Relini, A., Taddei, N., Dobson, C. M., Ramponi, G., Chiti, F. 2005. Amyloid formation from HypF-N under conditions in which the protein is initially in its native state. *J. Mol. Biol.* 347: 323-335.

Markgraf, D. F., Peplowska, K. and Ungermann, C. 2007. Rab cascades and tethering factors in the endomembrane system. *FEBS Lett.*, doi:10.1016/j.febslet.2007.01.090

Martinez, O., Schmidt, A., Salamero, J., Hoflack, B., Roa, M. A. and Goud, B. 1994. The small GTP-binding protein Rab6 functions in intra-Golgi transport. *J. Cell. Biol.* 127: 1575-1588.

Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H., Sugano, S. 2003. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene* 22: 3307-18.

Mckay, I. J., Muchamore, I., Krumlauf, R., Maden, M., Lumsden, A. and Lewis, J. 1994. The *kreisler* mouse: a hindbrain segmentation mutant that lacks two rhombomeres. *Development* 120: 2199-2211.

Mears, A. J., Kondo, M., Swain, P. K., Takada, Y., Bush, R. A., Saunders, T. L., Sieving, P. A., Swaroop, A. 2001. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat. Genet.* 29: 447-452.

Menasche, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulfraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., de Saint Basile, G. 2000. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. genet.* 25: 173-176.

Merithew, E., Hatherly, S., Dumas, J. J., Lawe, D. C., Heller-Harrison, R. and Lambright, D. G. 2001. Structural plasticity of an invariant hydrophobic triad in the switch regions of Rab GTPases is a determinant of effector recognition. *J. Biol. Chem.* 276: 13982-13988.

Meyers, J. M. and Prekeris, R. 2002. Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function. *J. Biol. Chem.* 277 (50): 49003-49010.

Moriguchi, T., Hamada, M., Morito, N., Terunuma, T., Hasegawa, K., Zhang, C., Yokomizo, T., Esaki, R., Kuroda, E., Yoh, K., Kudo, T., Nagata, M., Greaves, D. R., Engel, J. D., Yamamoto, M., Takahashi, S. 2006. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 26: 5715-5727.

Motohashi, H., Shavit, J. A., Igarashi, K., Yamamoto, M., Engel, J. D. 1997. The world according to Maf. *Nucleic Acids Res.* 25: 2953-2959.

Nanahoshi, M., Nishiuma, T., Tsujishita, Y., Hara, K., Inui, S. Sakaguchi, N. and Yonezawa, K. 1998. Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by alpha4 protein and its yeast homolog TAP42. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251: 520-526.

Nishimura, W., Kondo, T., Salameh, T., Khattabi, I. E., Dodge, R., Bonner-Weir, S., Sharma, A. 2006. A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic β -cells. *Dev. Biol.* 293: 526-539.

Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K. T., Kawai, S. 1989. v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7711-7715.

Onodera, K., Shavit, J. A., Motohashi, H., yamamoto, M., Engel, J. D. 2000. Perinatal synthetic lethality and hematopoietic defects in compound mafG::mafK mutant mice. *EMBO J.* 19: 1335-1345.

Opdam, F. J. M., Kamps, G., Croes, H., van Bokhoven, H., Ginsel, L. A., Fransen, J. A. M. 2000. Expression of Rab small GTPases in epithelial Caco-2 cells: Rab21 is an apically located GTP-binding protein in polarized intestinal epithelial cells. *Eur. J. Cell Biol.* 79: 308-316.

Ortiz, D., Medkova, M., Walch-Solimena, C. and Novick, P. 2002. Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J. Cell Biol.* 157: 1005-1015.

Ostermeier, C. and Brunger, A. T. 1999. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of Rabphilin-3A. *Cell* 96: 363-374.

Pasqualato, S., Senic-Matuglia, F., Renault, L., Goud, B., Salamero, J., Cherfils, J. 2004. The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *J. Biol. Chem.* 279 (12): 11480-11488.

Peden, A. A., Schonteich, E., Chun, J., Junutula, J. R., Scheller, R. H., Prekeris, R. 2004. The RCP-Rab11 complex regulates endocytic protein sorting. *Mol. Biol. Cell* 15 (8): 3530-3541.

Pedersen, J. S., Christensen, G., Otzen, D. E. 2004. Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *J. Mol. Biol.* 341: 575-588.

Peranen, J., Auvinen, P., Virta, H., Wepf, R. and Simons, K. 1996. Rab8 promotes polarized membrane transport through reorganization of actin and microtubules in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 135: 153-167.

Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C. 2000. The mammalian Rab Family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Rab superfamily. *J. Mol. Biol.* 301: 1077-1087.

Pereira-Leal, J. B. and Seabra, M. C. 2001. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 313: 889-901.

Pereira-Leal, J. B., Hume, A. N. and Seabra, M. C. 2001. Prenylation of Rab GTPases: molecular mechanisms and involvement in genetic disease. *FEBS Lett.* 498: 197-200.

Pfeffer, S. and Aivazian, D. 2004. Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 886-896.

Pfeffer, S. R. 2001. Rab GTPases: specifying and deciphering organelle identity and function. *Trends Cell Biol.* 11: 487-491.

Plakoutsi, G., Taddei, N., Stefani, M., Chiti, F. 2004. Aggregation of the Acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus*: the folded and partially unfolded states can both be precursors for amyloid formation. *J. Biol. Chem.* 279: 14111-14119.

Prekeris, R. 2003. Rabs, Rips, FIPs and endocytic membrane traffic. *The Scientific World Journal* 3: 870-880.

Pylypenko, O., Rak, A., Reents, R., Niculae, A., Sidorovitch, V., Cioaca, M. D., Bessolitsyna, E., Thoma, N. H., Waldmann, H., Schlichting, I., Goody, R. S. and Alexandrov, K. 2003. Structure of Rab escort protein-1 in complex with Rab geranylgeranyltransferase. *Mol. Cell* 11: 483-494.

Rak, A., Pylypenko, O., Niculae, A., Pyatkov, K., Goody, R. S., Alexandrov, K. 2004. Structure of the Rab7:REP-1 complex: insights into the mechanism of Rab prenylation and choroideremia disease. *Cell* 117: 749-760.

Raught, B., Gingras, A. C., Sonenberg, N. 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7037-7044.

Reza, H. M., Urano, A., Shimada, N., Yasuda, K. 2007. Sequential and combinatorial roles of *maf* family genes define proper lens development. *Molecular Vision* 13: 18-30.

Ring, B., Cordes, S., Overbeek, P., Barsh, G. 2000. Regulation of mouse lens fiber cell development and differentiation by the Maf gene. *Development* 127: 307-317.

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. and Zerial, M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122: 735-749.

Sadl, V. S., Sing, A., Mar, L., Jin, F. and Cordes, S. P. 2003. Analysis of hindbrain patterning defects caused by the *kreisler*^{enu} mutation reveals multiple roles of *Kreisler* in hindbrain segmentation. *Dev. Dynamics* 227: 134-142.

Salminen, A. and Novick, P. J. 1987. A ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. *Cell* 49: 527-538.

Seabra, M. C. and Wasmeier, C. 2004. Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Curr. Opin.Cell Biol.* 16: 451-457.

Seabra, M. C., Mules, E. H. and Hume, A. N. 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol. Med.* 8: 23-30.

Seeburg, P. H., Colby, W. W., Capon, D. J., Goeddel, D. V., Levinson, A. D. 1984. Biological properties of human c-Ha-ras 1 genes mutated at codon 12. *Nature* 312 (5989): 71-75.

Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J., Moslehi, J. J., Serpell, L., Arnsdorf, M. F., Lindquist, S. L. 2000. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289: 1317-1321.

Sevinsky, J. R., Whalen, A. M., Ahn, N. G. 2004. Extracellular signal-regulated kinase induces the megakaryocyte GPIIb/CD41 gene through MafB/Kreisler. *Mol. Cell. Biol.* 24: 4534-4545.

Shin, O. H., Ross, A. H., Mihai, I., Exton, J. H. 1999. Identification of arfophilin, a target protein for GTP-bound class II ADP-ribosylation factors. *J. Biol. Chem.* 274: 36609-36615.

Sieweke, M. H., Tekotte, H., Frampton, J., Graf, T. 1996. MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85: 49-60.

Sii-Felice, K., Pouponnot, C., Gillet, S., Lecoin, L., Girault, J-A., Eychène, A., Felder-Schmittbuhl, M-P. 2005. MafA transcription factor is phosphorylated by p38 MAP kinase. *FEBS Lett.* 579: 3547-3554.

Simpson, J. C., Griffiths, G., Wessling-Resnick, M., Fransen, J. A. M., Bennett, H., Jones, A. T. 2004. A role for the small GTPase Rab21 in the early endocytic pathway. *J. Cell Sci.* 117: 6297-6311.

Souillac, P. O., Uversky, V. N., Fink, A. L. 2003. Structural transformations of oligomeric intermediates in the fibrillation of the immunoglobulin light chain LEN. *Biochemistry* 42: 8094-8104.

Stefani, M. and Dobson, C. M. 2003. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* 81: 678-699.

Stein, M-P., Dong, J., Wandinger-Ness, A. 2003. Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic interventions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 1421-1437.

Stenmark, H. and Olkkonen, V. M. 2001. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2(5): reviews 3007.1-3007.7.

Stinchcombe, J. C., Barral, D. C., Mules, E. H., Booth, S., Hume, A. N., Machesky, L. M., Seabra, M. C., Griffiths, G. M. 2001. Rab27a is required for regulating secretion in citotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 152: 825-833.

Stroupe, C. and Brunger, A. T. 2000. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J. Mol. Biol.* 304: 585-598.

Sunde, M. and Blake, C. 1997. The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Advan. Protein Chem.* 50: 123-159.

Swaroop, A., Xu, J. Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C., Agarwal, N. 1992. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 266-270.

Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. and Parton, R. G. 1996. RAB11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endossome. *J. Cell Biol.* 135(4): 913-924.

Uversky, V. N. and Fink, A. L. 2004. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochem. Biophys. Acta* 1698: 131-153.

Walch-Solimena, C., Collins, R. N. and Novick, P. J. 1997. Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J. Cell Biol.* 137: 1495-1509.

Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. 2004. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept. Letters* 11: 213-228.

Wang, P. W., Eisenbart, J. D., Cordes, S. P., Barsh, G. S., Stoffel, M., Le Beau, M. M. 1999. Human KRML (MAFB): cDNA cloning, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics* 59: 275-281.

Wang, W. and Ferro-Novick, S. 2002. A Ypt32p exchange factor is a putative effector of Ypt1p. *Mol. Biol. Cell* 13: 3336-3343.

Wang, X., Kumar, R., Navarre, J., Casanova, J. E. and Goldenring, J. R. 2000. Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by RAB11A and RAB25. *J. Biol. Chem.* 275(37): 29138-29146.

Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J. 2005. The Ras superfamily at a glance. J. Cell Sci. 118: 843-846.

Wittmann, J. G. and Rudolph, M. G. 2004. Crystal structure of Rab9 complexed to GDP reveals a dimer with an active conformation of Switch II. *FEBS Lett.* 568: 23-29.

Yang-Feng, T. L. and Swaroop, A. 1992. Neural retina-specific leucine zipper gene NRL (D14S46E) maps to human chromosome 14q11.1-q11.2. *Genomics* 14: 491-492.

Yoshida T. and Yasuda K. 2002. Characterization of the chicken L-Maf, MafB and c-Maf in crystallin gene regulation and lens differentiation. *Genes Cells*. 7(7):693-706.

Zerial, M. and Huber, L. A. 1995. Guidebook to the small GTPases. Oxford, UK: Oxford University Press.

Zerial, M. and McBride, H. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2): 107-117.

Zhan, F., Huang, Y., Colla, S., Stewart, J. P., Hanamura, I., Gupta, S., Epstein, J., Yaccoby, S., Sawyer, J., Burington, B., Anaissie, E., Hollmig, K., Pineda-Roman, M., Tricot, G., van Rhee, F., Walker, R., Zangari, M., Crowley, J., Barlogie, B., Shaughnessy Jr, J. D. 2006. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108: 2020-2028.

Zhang, B. and Zheng, Y. 1998. Negative regulation of Rho family GTPases Cdc42 and Rac2 by homodimer formation. *J. Biol. Chem.* 273 (40): 25728-25733.

Zhu, G., Liu, J., Terzyan, S., Zhai, P., Li, G., Zhang, X. C. 2003. High resolution crystal structures of human Rab5a and five mutants with substitutions in the catalytically important phosphate-binding loop. *J. Biol. Chem.* 278 (4): 2452-2460.





Laboratório Nacional de Luz Sincrotron Operado pela ABTLuS para o CNPg / Ministério da Ciência e Tecnología

Campinas, 02.04.2007

Para quem possa interessar:

Veio através desta confirmar, que os projetos citados abaixo são projetos analisados e aprovados pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) da ABTLuS:

Projeto No.: NITZ01: "Determinação da estrutura tridimensional das proteínas TRIP-1 e INT6 e caracterização da função da proteína INT6 no controle da proliferação e na iniciação da tradução"

Projeto No.: NITZ06: "Análise da regulação das proteínas 04 e TIP41, envolvidas na via de sinlização sensível a rapamycina"

Nosso laboratório possui o "Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB)", No. 0113/99 (data de publicação: 27.09.1999; Processo No.: 01200.001042/99-41).

Presidente de CHBio - ABTLuS Prof. Dr. Jörg Kobarg

 Fone:
 019-3512-1125

 Fax:
 019-3512-1006

 E-mail:
 jkobarg@inls.br