

Tesis Doctoral

Influencia de la fosforilación dependiente de PKA sobre la conformación y función de la GTPasa Rap 1b

Edreira, Martín Miguel

2009-10-09

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

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

Cita tipo APA:

Edreira, Martín Miguel. (2009-10-09). Influencia de la fosforilación dependiente de PKA sobre la conformación y función de la GTPasa Rap 1b. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Edreira, Martín Miguel. "Influencia de la fosforilación dependiente de PKA sobre la conformación y función de la GTPasa Rap 1b". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009-10-09.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento Fisiología, Biología Molecular y Celular

***INFLUENCIA DE LA FOSFORILACIÓN DEPENDIENTE DE PKA SOBRE
LA CONFORMACIÓN Y FUNCIÓN DE LA GTPasa Rap1b***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
en el área Ciencias Biológicas

Autor

Lic. Martín M. Edreira

Director de Tesis

Dr. Daniel L. Altschuler

Department of Pharmacology and Chemical Biology,
School of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

Buenos Aires, 2009

A Mariana, Tomas, Martus, Fergus...

Por hacer que en mi vida el resto sea secundario.

Agradecimientos

Cuando en el año 98 comencé mi Tesis de Doctorado realmente no calculaba que me llevaría nada menos que 11 años. Aún así, el tiempo y los cambios asociados, me han permitido disfrutar numerosas experiencias, viendo y viviendo la ciencia desde distintas perspectivas. Ha sido un largo camino, plagado de alegrías y algunas asperezas, pero con un balance final feliz.

Entrando en esta última etapa de mi Doctorado, quiero agradecer al Dr. Daniel L. Altschuler, Danny “Chuchu” Altschuler, un amigazo primero, un excelente Director-Científico después. Fuente inagotable de conocimiento (teórico y práctico), poseedor de una inteligencia extraordinaria y de una honestidad brutal, la calidad humana de Danny va mucho, pero mucho más allá de solo ser un buen tipo. Desde el primer día no solo me abrió la puerta de su laboratorio, sino que también la de su casa y gesto que cuando uno está lejos de los suyos no tiene precio. Dicen que detrás de todo buen hombre hay una buena mujer, al lado de Danny está Laura, quien tiene el mismo grado de culpabilidad por habernos hecho sentir tan bien durante todo este tiempo... la verdad los vamos extrañar horriblemente.

No quiero dejar de incluir a Gabi y Ariel “Harry” Altschuler... aunque ellos deberían estar escribiendo conmigo agradeciendo por los viejos que tienen.

El laboratorio de Danny por momentos fue una sucursal de Argentina en PITT, trabajar entre amigos, mates, risas y fútbol de por medio me hizo sentir como en casa y eso gracias a Daniel “Hoch” Hochbaum, y mi hermano adoptivo menor Guillermo “El Nene” Barila. Y más recientemente, con la incorporación de Leonel “Pulpi” Joannas la cosa solo mejoró. La verdad muchachos que no habremos aprendido mucho inglés, pero la pasamos fenomenal!

I would also like to thank Kyoungja Honk. In these last years I think I've spent more time with her at the lab than with my family at home. I'm already missing the daily Korean newspaper report, just from the other side of the bench. These have been fun years with lots of scientific talks and lots of very enjoyable non-sense chats, that were even more interesting. On top that I really appreciate all the data you shared with me.

To the past members of the Altschuler Lab, Angelica “tujeder” Hogg and Gregg “Greggy” Kotchey with whom I had the most interesting and agitated politics arguments... until I knew I would never ever win one.

Quiero agradecer al segundo aluvión migratorio latino que invadiera el Dept de Pharmacology, Carlos “Fuser” Batthyany, “El” Gustavo Bonacci, Franky Schopfer “Montalban”,

quienes incrementaran la ronda de mates, aportaran algunas ideas y muchisima “habilidad” al Transgenic Mice Soccer Team.

Switching back to english, I would like to thank the present and past members of Transgenic Mice, specially my friend and big River Plate fan Neil “D XOTIC 1” Bhola.

Special thanks to my big friends Nicolas “Kelso” Khoo and Eric Eugene “Reddy” Kelley (AKA SlimFat), for all the good moments we share together such us... mmm... well... maybe I’ll come back to this later...

To Tanja Rudoph for the translation of my brother’s German paperwork, the chats and coffees while waiting the FLPC to finish.

Pittsburgh fue mi casa y su gente mi familia, quiero agradecer también a los que presentes fuera del lab, pero no menos importantes: Ceci Cirio, La Ana y El Valentín, Bea, Guillermo-Gustavo y el Rulo, Francesca, María, Jorgito Genovese, Rosi y Jorge Jr., Calitos y Asli, los Reds, los Montalban, vecinos y amigos de Boltimore Herny Lorenzi y Sole, y a todos aquellos con los que hemos compartido esta rara sensación de intentar sentirnos como en casa estando a 7 mil kilómetros.

Por último a mis amigos de casa, mis hermanos, mi abuela, mis viejos, a quienes agradeceré eternamente el hecho de siempre estar presentes.

Con Mariana y Martus vinimos a Pittsburgh a ver que nos deparaba el destino. Han pasaron muchas buenas, algunas malas, pero nada mas lindo que agrandar la familia y hoy volver al hogar con sus nuevos integrantes Fergus y nada menos que Tomasinos.

Parte de los resultados de esta tesis fueron publicados en:

“Phosphorylation-induced conformational changes in Rap1b: allosteric effects on switch domains and effector loop”. Journal of Biological Chemistry, en prensa.

Disponible online: Agosto 2009.

PMID: 19651783

“It is the tension between creativity and skepticism that has produced the stunning and unexpected findings of science.” ~ Carl Sagan

Indice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	
La Superfamilia Ras	4
Rap1b	9
Activación/Desactivación de Rap1b	10
Efectores de Rap1b	10
AMPc como segundo mensajero	11
Rap1b como mediador de la señal mitogénica del AMPc	11
Función de la fosforilación de Rap1b dependiente de PKA	12
Materiales y Métodos	
Reactivos y Anticuerpos	15
Plásmidos y Subclonados	15
Expresión, purificación y fosforilación <i>in vivo</i> de Rap1b	15
Dicroísmo Circular	16
Análisis del nucleótido	17
Activación de Rap1b utilizando RalGDS-RBD	17
Optimización de las condiciones de fragmentación	17
Intercambio Hidrogeno-Deuterio	18
Modelado del extremo C-terminal de Rap1b	19
Cristalografía	19
Cultivos celulares y transfecciones	20
Ensayo de doble híbrido en levadura	20
Inmunofluorescencia y microscopia	21
ARN interferente	21
Cuantificación de la proliferación por marcado con BrdU	21
Cuantificación del AMPc intracelular	22

Capítulo I

Resultados

Purificación y fosforilación de Rap1b	24
Análisis de la integridad estructural	26
Dicroísmo Circular	26
Análisis Nucleotídico	27
Ensayo de Activación	28
Activación de Rap1b mediada por PKA	29
Activación de Rap1b en células de tiroides	30
Efecto de la inhibición de PKA sobre la cinética de activación de Rap1	30
Efecto de la activación selectiva de PKA sobre la activación de Rap1b	31
Fragmentación proteolítica de Rap1b	32
DXMS	33
Estructura cristalográfica de Rap1b	43
Discusión	45
Capítulo II	
Resultados	
Identificación de nuevos efectores de Rap1b	51
Colocalización CAP1/Rap1b	52
Caracterización de la interacción Rap1b/CAP1	53
Evaluación de la dependencia de la fosforilación y nucleótido	53
Interacción entre CAP1 y mutantes del dominio efector de Rap1b	54
Importancia de la isoprenilación en la interacción Rap/CAP	56
Efectos de proteínas reguladoras de Rap1b sobre la interacción Rap1b/CAP	57
Efectos de la fosforilación PKA dependiente sobre la interacción Rap1b/CAP	59
Acción biológica de la asociación Rap1b y CAP1	60
Supresión de la expresión de CAP1 por ARN interferente	61
Efectos de CAP1 sobre la activación y fosforilación de Rap1b	62
Efecto de CAP sobre la producción de AMPc	63
Discusión	65
Conclusiones	70
Referencias	73

Resumen

La activación de Rap1b por la proteína de intercambio activada por AMPc (Epac) y su fosforilación mediada por la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), son requeridas para la mitogénesis dependiente de AMPc. Sin embargo, el rol de la fosforilación permanece incierto.

Evaluamos potenciales cambios conformacionales inducidos por la fosforilación de Rap1b, utilizando el intercambio hidrogeno/deuterio acoplado a espectroscopia de masa (DXMS) y cristalografía. Velocidades de intercambio hidrogeno/deuterio para Rap1b fosforilada (Rap1-P) y fosfomimética (Rap1-D) mostraron un perfil de intercambio idéntico, con velocidades incrementadas en regiones discretas a lo largo de la proteína, incluyendo un dominio alrededor del sitio de fosforilación y la región efectora. La estructura cristalina de Rap1b-G12V-S179D mostró que la presencia del S179D induce cambios en la interfase con los switch I y II.

Nuestro segundo objetivo fue la búsqueda de efectores de Rap1b modulados por fosforilación. Entre los clones aislados por doble híbrido, se encontró la proteína asociada a la adenilil ciclasa 1 (CAP1). Rap y CAP presentaron una asociación independiente del nucleótido, pero dependiente de la isoprenilación de Rap1b. Aunque la fosforilación demostró modular negativamente esta interacción, su efecto sobre la señal mitogénica mediada por Rap1 fue positivo. CAP1, actuando como proteína andamio de Rap, resultó necesaria para la acción de Rap1, siendo requerida además para su activación y fosforilación, efecto que estaría mediado por la estimulación del aumento de los niveles de AMPc.

Palabras Clave: AMPc, PKA, fosforilación, Epac, Rap1b, alosteric effect, CAP1

Abstract

Activation of Rap1b by the exchange protein activated by cAMP (Epac) and its cAMP-dependent protein kinase (PKA)-mediated phosphorylation are required for cAMP dependent mitogenesis. However, the role of phosphorylation remains unknown.

We assessed potential conformational changes induced by phosphorylation of Rap1b using the amide hydrogen/deuterium exchange mass spectroscopy (DXMS) and Crystallography. Exchange rates PKA-phosphorylated (Rap1-P) and phosphomimetic (Rap1-D) Rap1b proteins showed the same pattern of exchange, revealing an increased exchange rate in discrete regions along the protein, including a domain around the phosphorylation site and the effector domain. Crystal structure for the full length Rap1b-G12V-S179D showed that the presence of the S179D induce changes at the interface with switch I and II.

Our second objective was finding Rap1b effectors modulated in a phospho-dependent fashion.. Within the clones isolated by Two Hybrid, we found the adenylate cyclase-associated protein 1 (CAP1). Rap/CAP association showed to be nucleotide independent, but dependent on Raps' isoprenylation. Although, phosphorylation showed to negatively modulate this interaction, it had positive effect on the mitogenic signal mediated by Rap1. CAP, acting as a scaffolding protein for Rap1b, was necessary for Rap1 mediated action, and required for Rap1b activation and phosphorylation, effect mediated by stimulating the increase of the levels of cAMP.

Keywords: cAMP, PKA phosphorylation, Epac, Rap1b, allosteric effect, CAP1

Introducción

“Equipped with his five senses, man explores the universe around him and calls the adventure Science.” ~ Edwin Powell Hubble, *The Nature of Science*, 1954.

La Superfamilia Ras

La superfamilia de la pequeña guanosina trifosfatasa (GTPasa) Ras está compuesta por más de 150 proteínas, subdivididas, en base a secuencia y similitudes funcionales, en al menos 5 familias: Ras, Rho, Rab, Ran y Arf (figura 1) [1, 2]. Los miembros de la superfamilia Ras son proteínas monoméricas de unos 21KDa y comparten la característica bioquímica de unir e hidrolizar GTP. Esta propiedad les confiere la capacidad de actuar como interruptores moleculares en la transducción de estímulos externos, controlando un diverso rango de procesos biológicos al alternar entre una forma activa (unida a GTP) y una forma inactiva (unida a GDP) [3]. El intercambio de GDP/GTP se encuentra finamente regulado por factores de intercambio de guanosina (GEFs), que aceleran la velocidad de este intercambio en varios ordenes de magnitud [4]. La función de los GEFs consiste en llevar a una conformación transitoria libre de nucleótido, seguida de la rápida carga de GTP [5, 6]. El mantenimiento de la conformación activa dependerá de la actividad GTPasa intrínseca y será esta la que determine la estequiometría de la interacción con los efectores. Además, existen factores celulares específicos de activación de la actividad GTPasa (GAPs), que inducen la inactivación de la proteína a través de la estimulación de la hidrólisis del GTP (figura 2) [3, 7].

En el caso de las familias Rho y Rab, existe un nivel adicional de regulación mediado por los inhibidores de la disociación de guanidina (GDIs), los cuales se unen específicamente a la forma inactiva de las GTPasas, inhibiendo la liberación del GDP y prolongando de esta forma el estado inactivo. Esta interacción permite a los GDIs secuestrar a las GTPasas en el citoplasma, impidiendo la unión de las mismas a la membrana celular [8, 9].

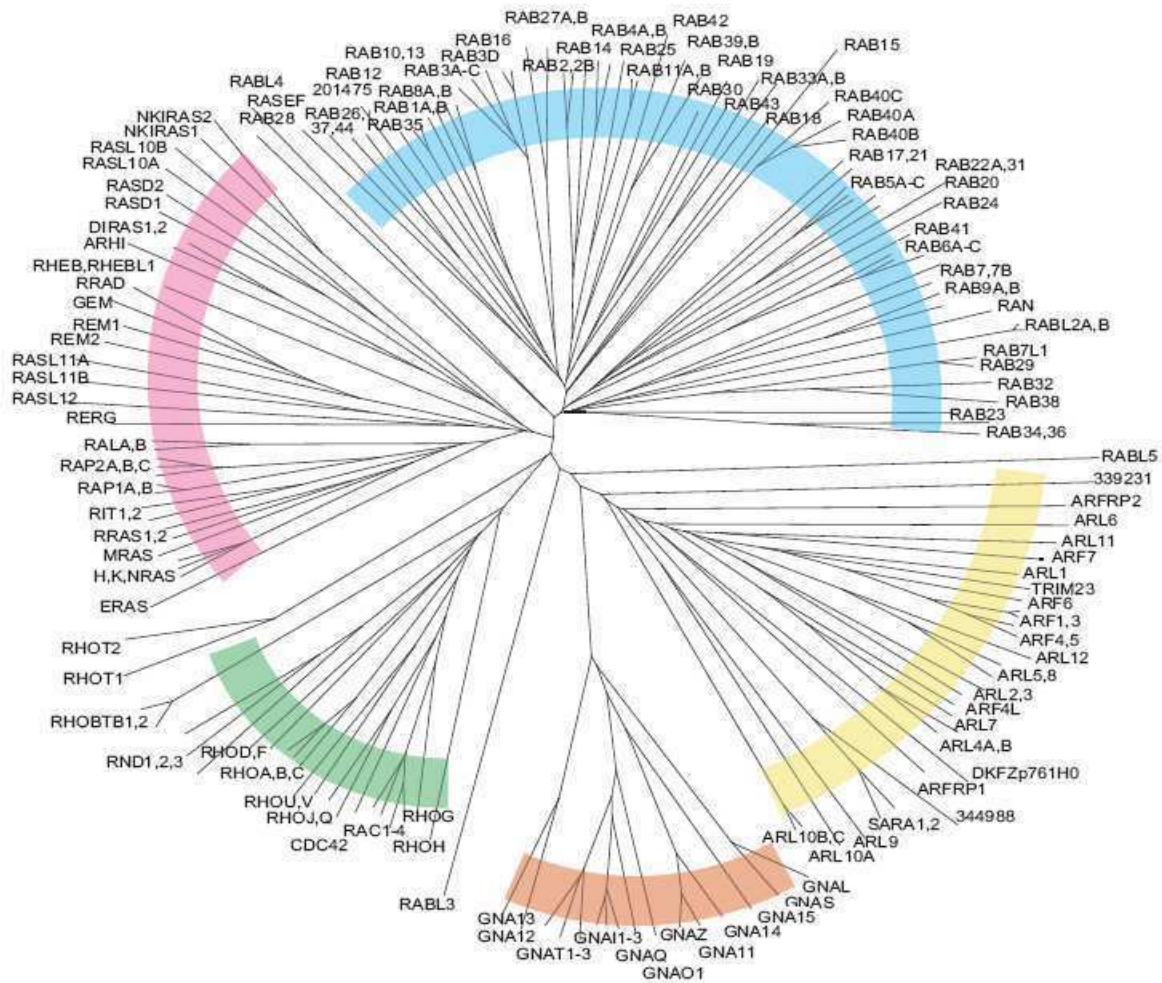


Figura 1. Análisis comparativo de las secuencias de los miembros de la Superfamilia Ras humana. El largo de las ramas es directamente proporcional al número de diferencias en las secuencias comparadas. Las Subfamilias están indicadas en colores: RAS (rosa) RHO (verde), G α (marrón), ARF (amarillo) y RAB (azul). Extraído de Colicelli, J., *Sci. STKE*, 2004. **2004**(250).

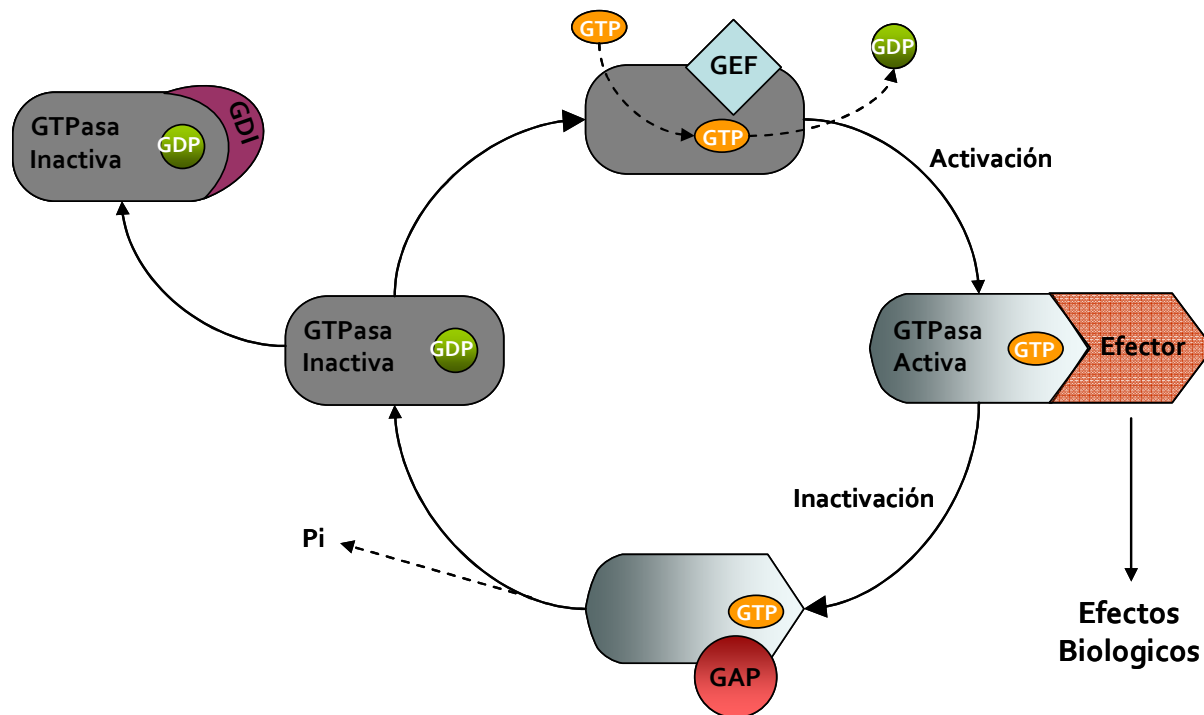


Figura 2. Ciclo de las pequeñas GTPasas. Las GTPasas inactivadas (unidas a GDP), son activadas por GEFs que promueven el intercambio GDP/GTP. En su estado activado interactúan con efectores, hasta la inducción de la inactivación por la hidrólisis del GTP, estimulada por GAPs. Para las subfamilias de Rho y Rab existe un nivel adicional de regulación mediado por los inhibidores de la disociación de guanidina

Las funciones básicas de unión e hidrólisis del nucleótido, poseen una estructura y mecanismo de switch conservados dentro de la superfamilia [10]. Este dominio, llamado dominio G, se encuentra compuesto por una serie de 5 elementos estructurales críticos en el intercambio GDP/GTP, los cambios conformacionales inducidos por la unión del GTP y la hidrólisis del nucleótido (figura 3).

La región G1, llamada también loop P (loop de unión al fosfato), tiene una secuencia consenso GX_4GKS/T , la cual abarca los aminoácidos 10 a 17, e interactúa con los fosfatos β y γ del grupo fosfato del nucleótido. El dominio G2, coincide con el dominio de reconocimiento de efectores (residuos 32-40) y solo posee un residuo conservado dentro de la superfamilia. Este residuo, una treonina en posición 35 de Ras, está involucrada en la unión del Mg^{2+} y la interacción con el fosfato γ , se encuentra en una de las regiones que sufre mayores cambios en la orientación al unir GTP. El ácido aspártico y la glicina del motivo DXXG, correspondiente a G3 (residuos 53-62), están involucrados en la unión del Mg^{2+} y la estabilización del nucleótido.

Residuos de la región G4 (112-119, N/TKXD) interactúan con la base del nucleótido y estabilizan las interacciones de G1 con el mismo. Por último, los residuos SAK (G5) interactúan con el nucleótido principalmente de manera indirecta a través de G1, ya que solo el residuo A146 se encuentra en contacto directo con el nucleótido [10, 11](figura 3).

Además de las secuencias consenso responsables de la interacción con el nucleótido y la actividad GTPasa, las proteínas pertenecientes a las subfamilias de Ras, Rho y Rab, presentan en el extremo C-terminal una región hipervariable (HVR). El primer segmento de la HVR hacia el N-terminal, corresponde a una secuencia de conexión (C), que modularía la interacción con proteínas reguladoras y efectoras [12]. Por otra parte, contiene un dominio polibásico (PB) y un motivo CAAX (C: cisteína, A: Alifático, X: residuo terminal), involucrados en la asociación a membranas, interacción con proteínas y sublocalización celular [13-15]. En el caso de la subfamilia de Ras, la señal de isoprenilación dirige la farnesilación o geranilgeranilación de la cisteína en posición 181, seguida de la proteólisis del AAX y la metilación de la cisteína modificada [16, 17](figuras 3 y 4).

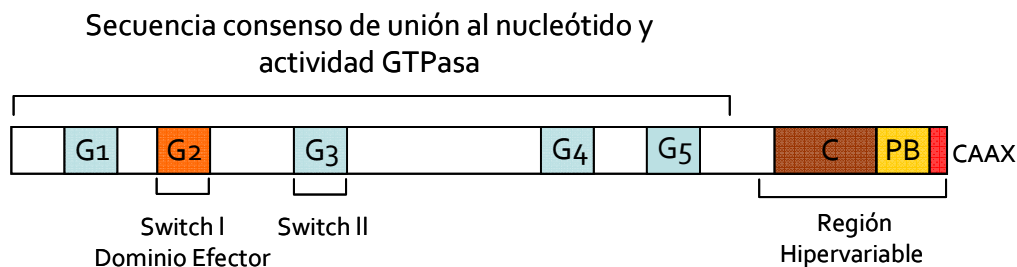


Figura 3. Esquema de la estructura de la superfamilia de pequeñas GTPasas Ras. Regiones conservadas dentro del dominio G (G1-G5) y región C-terminal hipervariable (C, PB y CAAX).

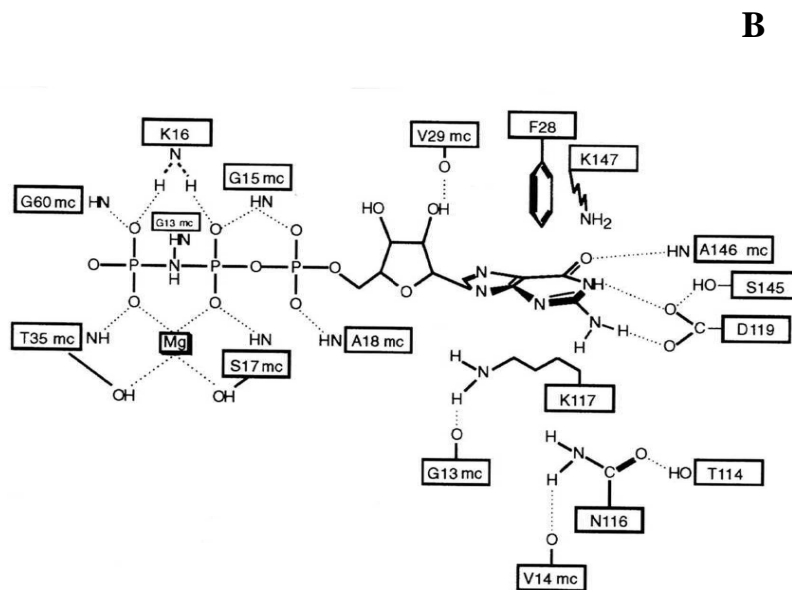
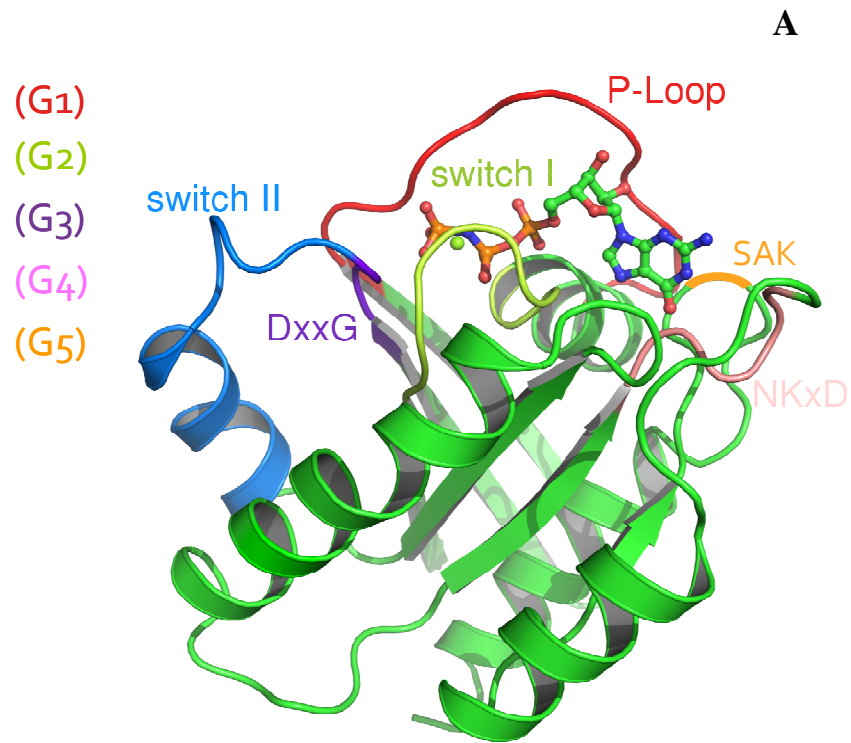


Figura 4. Estructura de Ras. A) Estructura tridimensional de Ras, mostrando las regiones pertenecientes al dominio G. B) Detalle de los residuos involucrados en la interacción con el GTP y Mg^{2+} .

El reconocimiento de efectores se encuentra regulado por cambios conformacionales dependientes del nucleótido. Estudios estructurales en Ras han demostrado la existencia de dos regiones que sufren cambios conformacionales drásticos como consecuencia de la activación por GTP [18]. Estas regiones son el switch I (aminoácidos 30-40), que incluye el dominio de reconocimiento de efectores (aminoácidos 32-40), y el switch II (residuos 60-76), que participa en el anclaje del nucleótido y en la interacción con proteínas reguladoras. Asimismo, análisis estructurales comparativos revelaron que el aparato de switch GDP/GTP es una estructura canónica conservada en la superfamilia, pero con un diverso rango de efectores y reguladores [10] (figura 4).

Rap1b

Las proteínas Rap fueron originalmente identificadas a través de 3 estrategias diferentes: unión a GTP γ S35 (smgp21) [19], hibridación de baja astringencia utilizando sondas para Ras (Rap, Ras proximate) y su clonado a partir de la expresión como revertante de Ras (Krev1, K-Ras revertant) [20].

A pesar que Rap1 solo tiene una identidad de secuencia del 50% con Ras, sus dominios efectores son indistinguibles [21], sugiriendo que ambas proteínas poseen funciones similares o tal vez antagónicas. La presencia de dominios efectores idénticos y la habilidad de Rap1 de revertir la transformación celular mediada por Ras, reforzaron la noción original que consideraba que Rap1 era una proteína anti-mitogénica cuya función es antagonizar los efectos de Ras [22]. Esta hipótesis fue sustentada a través de resultados que demostraron que la interacción de Rap1 con moduladores [23, 24] y proteínas efectoras típicas de Ras [25], no conducían a la activación de los mismos [26]. A partir de estas observaciones surgió un modelo en el cual la habilidad de Rap1 para formar complejos no productivos con moléculas efectoras de Ras, explicarían sus efectos anti-mitogénicos.

A pesar de esto, fue posteriormente demostrado que la actividad de Rap1 no siempre interferiría con los eventos de señalización de Ras [27, 28], sugiriendo que el funcionamiento de Rap1 sería a través de una vía distinta a la de Ras, pero empleando potencialmente un set de proteínas efectoras similares [29].

Activación/Desactivación de Rap1b

Rap1b es expresada de manera ubicua y ha sido implicada en un gran rango de funciones celulares, como ser proliferación, adhesión, polarización y morfogénesis. Su activación por estímulos externos esta mediada por distintas vías de señalización, dependiendo del tejido y el receptor celular involucrados. Los principales mensajeros secundarios que inducen la activación de Rap1 son el calcio [30], diacilglicerol [31] y AMPc [32, 33].

Ante la diversidad de funciones biológicas de Rap1b, una de las formas de las que dispone la célula de discernir y coordinar coherentemente una respuesta celular sería a través del modo de activación de Rap1b. Existe para Rap1 una gran variedad de GEFs que regulan el intercambio GDP/GTP [34], entre los que se han descrito C3G [35], Epac1 [36, 37], Epac2 [36], PDZ-GEF1 [38], CalDAG-GEFI [39], RasGRP2 [40], CalDAG-GEFIII [41], GRF [42], PLC ϵ [43] y DOCK4 [44].

Por otra parte, la desactivación de Rap1 se lleva a cabo a través de la inducción de su actividad GTPasa intrínseca, mediada por GAPs específicas como: Rap1GAPI [45-47] y Rap1GAPII [48, 49], tuberin [50] y los miembros de la familia de Spa-1, Spa-1 [51], Spal [52, 53], E6TP1 [54], SPAR [55] y SPAR2 [56].

Efectores de Rap1b

La hipótesis de la interacción de Rap1 con los efectores tradicionales de Ras, sin que esto implique necesariamente su activación [57], fue comprobada para la familia de Raf (Raf1 [18] y B-raf [58, 59]), la subunidad catalítica p110 α de la phosphatidylinositol 3 quinasa [60] y los miembros de la familia de los RalGEF (RalGDS [61], Rlf [62] y Rgl [25]). Es aún hoy controvertido y objeto de discusión los efectos *in vivo* de estas interacciones [60].

Otros efectores identificados para Rap1 son los adaptadores RAPL, Riam, AF-6 y Krit, los GEFs de la familia Rho, Tiam1 y Vav2, y las RhoGAPs, RA-RhoGAP y Ara3 [27, 63, 64]. Asimismo, han sido descritas proteínas andamio involucradas en la localización y modulación de la actividad de Rap1 como PDK1 [65] y IQGAP1 [66].

AMPC como segundo mensajero

Desde su descubrimiento, por Rall y Sutherland, en el año 1957 [67, 68], el AMPc ha sido implicado como mensajero secundario una gran variedad de procesos biológicos [69]. El AMPc es producido a partir de ATP por la adenilil ciclasa, cuya acción se encuentra regulada por proteínas G asociadas a receptores (GPCRs) inducidos por diversos estímulos externos. Una de las funciones reconocidas del AMPc es la capacidad de modular la proliferación celular [70]. Sorprendentemente, esta modulación puede ser positiva o negativa, dependiendo del tipo celular [71-73]. La activación de la proliferación ha sido descrita para varios modelos [74]. Este efecto mitogénico fue observado *in vivo* e *in vitro*, particularmente en líneas celulares de origen endócrino y con un cierto grado de diferenciación [75, 76].

La quinasa dependiente de AMPc (PKA), identificada a fines de la década del 60 [77], representó durante mucho tiempo el único blanco conocido en células de mamífero para el AMPc. En su estado inactivo, PKA es una holoenzima tetramérica compuesta por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C), de las cuales se han logrado identificar varias subunidades R (RI α , RI β , RII α , RII β) y varias subunidades C (C α , C β , C γ). La unión de dos moléculas de AMPc a las subunidades regulatorias resulta en la liberación de las subunidades catalíticas, las cuales poseen varios blancos celulares [70].

En los últimos 10 años se han identificado nuevos blancos para el AMPc, como los canales catiónicos dependientes de AMPc [78] y la proteína intercambiadora dependiente de AMPc (Epac), un nuevo GEF para Rap1b [36]. Epac posee un dominio de reconocimiento capaz de unir una molécula de AMPc, induciendo cambios conformacionales que llevan a la exposición del sitio catalítico, con el consecuente reconocimiento y activación de Rap1 [79].

Rap1b como mediador de la señal mitogénica del AMPc

La existencia de un llamativo paralelo entre los efectos del AMPc y la acción de Rap1b sobre la proliferación celular, ha sugerido una íntima relación entre Rap1 y los efectos biológicos del AMPc. En sistemas donde el AMPc inhibe la proliferación, la acción de Rap1b es también inhibitoria [80, 81], mientras que Rap1b estimula la mitogénesis en células donde el AMPc es un activador de la proliferación celular [82, 83].

La acción de agonistas que inducen la elevación en los niveles intracelulares de AMPc y estimulan la rápida fosforilación [33] y activación de Rap1b [84], ha llevado a plantear la hipótesis que Rap1b podría mediar la acción biológica del AMPc [83]. Como confirmación de la misma, se observó que la expresión exógena de Rap1b en fibroblastos Swiss 3T3, sistema en el cual el AMPc es un regulador positivo de la proliferación [85], era capaz de conferir propiedades mitogénicas y oncogénicas [83], mediante a la habilidad de Rap1b de promover el ingreso a la fase S (síntesis de ADN). En consecuencia, fue introducido un nuevo concepto en el que Rap1b podría ser considerado un oncogén condicional: Los efectos mitogénicos de Rap dependen de programas celulares de transducción de señales específicos, de manera que Rap1b, como el AMPc, pueden estimular o inhibir la proliferación celular [83].

Este concepto fue evaluado en una línea células foliculares diferenciadas de tiroides PCCL3 [82, 86], la cual requiere de la Hormona Estimulante de Tiroides (TSH) para obtener una respuesta mitogénica completa. Estos estudios demostraron que la estimulación hormonal dependiente de AMPc sobre la progresión G1/S, precisa de Rap1b unida a GTP y fosforilada. Resultados recientes demuestran un comportamiento oncogénico de Rap1b *in vivo*: la expresión específica, en células foliculares de tiroides de ratones transgénicos, de una mutante constitutivamente activa de Rap1b condujo al desarrollo de una hiperplasia benigna, adenoma y carcinoma de tiroides, dependiente de hormona [87].

De esta forma, el dogma original en el que Rap1b poseía solamente funciones anti-mitogénicas y anti-transformantes, por oposición a la acción oncogénica de Ras, ha sido ampliado al demostrar la participación de Rap1b como parte de la maquinaria involucrada en la transducción de la señal mitogénica del AMPc. Al mismo tiempo, se introduce una nueva noción como ser el estricto requerimiento de la fosforilación de una pequeña proteína G para el desarrollo de su función en la transducción de la señal.

Función de la fosforilación de Rap1b dependiente de PKA

La fosforilación de proteínas cumple un papel de gran importancia como mecanismo de modificación postraduccional, regulando la conformación y actividad de muchas proteínas.

En el caso de Rap1b, la fosforilación dependiente de PKA fue originalmente descrita en sistemas libres de células en respuesta a agonistas que incrementan los niveles de AMPc en

plaquetas humanas. La misma ha sido involucrada en la translocación de Rap de la membrana al citosol [88, 89], probablemente aumentando la capacidad de Rap1b de unirse a un estimulador de la disociación de guanidina (GDS) [90]. Sin embargo, la fosforilación de Rap1 no presentó efectos sobre la reacción basal de intercambio GTP/GDP, la velocidad intrínseca de hidrólisis de GTP, o la habilidad de ser estimulada por una RapGAP citosólica [90, 91].

Evidencias de un rol de la fosforilación dependiente de PKA como modulador de la asociación de Rap1 con otras proteínas fue reportada para Citocromo b558 [92] y Raf-1 [93]. Sin embargo, la información disponible acerca de la fosforilación de Rap1 es extremadamente limitada. La estructura de Rap1b ha sido resuelta en asociación con c-Raf-1 [18], Epac2 [94] y RapGAP [95] (figura 5) y fueron obtenidas a partir de una versión truncada de Rap1b (1-167), carente del sitio de fosforilación (S179). Por esta razón, es aún hoy incierto el rol que juega la fosforilación sobre la estructura de Rap1b y su acción mitogénica. Podemos hipotetizar que una posible función de la fosforilación sería afectar la dinámica de la interacción con las proteínas efectoras, ya sea modulando su unión a nivel local a través de la creación de una nueva superficie de interacción con efectores; o alostericamente, afectando la conformación de otros dominios.

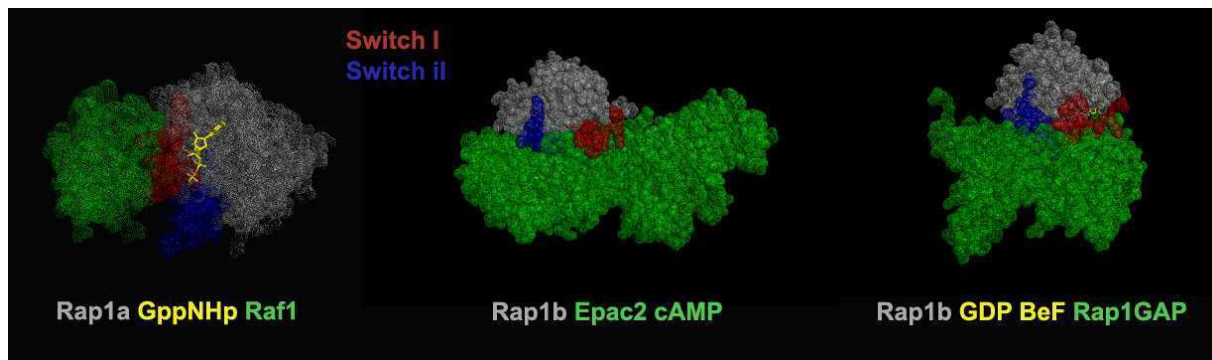


Figura 5. Estructuras conocidas de Rap1b. De izquierda a derecha, estructuras de Rap1b (gris) en complejo con el RBD de Raf-1, Epac2 y Rap1GAP (verde), respectivamente. Se indica la posición del análogo de AMPc utilizado (amarillo) y los switch I y II (rojo y azul respectivamente).

Con la intención de dilucidar el papel de la fosforilación de Rap1b, nuestro primer objetivo fue evaluar los efectos de la fosforilación mediada por PKA sobre la conformación de Rap1b, utilizando para ello técnicas tales como el intercambio hidrógeno/deuterio acoplado a HPLC y espectrometría de masa (DXMS) y cristalografía. El paso siguiente, fue la búsqueda de efectores de Rap1b que presentaran una modulación fosfo-dependiente.

Materiales y Métodos

“However beautiful the strategy, you should occasionally look at the results.” Winston Churchill

Reactivos Químicos y Anticuerpos

La Hormona Estimulante de Tiroides (TSH) y la Bromodeoxiuridina (BrdU) fueron adquiridas de Sigma. La Forskolina (FK), isobutilmetilxantina (IBMX), inhibidores de proteasas y H89 fueron obtenidos de Calbiochem, la glutation-agarosa de GE Healthcare, el análogo de AMPc para PKA (*N*⁶-benzoyladenosina-3', 5'-monofosfato cíclico) de Axxora Biolog. Los anticuerpos monoclonales contra los epitopes HA (HA.11) y Myc (9E10) fueron adquiridos de Covance, los anticuerpos anti-Rap1b de Proteintech Group, anti-GST de Invitrogen y el anti-P-Rap1 desarrollado in-house. El anti-BrdU fue de Biotools International. El anti-CAP1 fue gentilmente provisto por el Dr. J. Field de la University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

Plásmidos y Subclonados

Los fragmentos correspondientes a Rap1b-G12V-C181G y Rap1b-G12V-S179D-C181G, fueron subclonados como proteína de fusión a una cola de histidinas entre los sitios de restricción NdeI y XhoI del plásmido de expresión bacteriana pET28c (Novagen). La subunidad catalítica de la PKA fue subclonada en el sitio NcoI-SalI del pACYCTDuet-1 (Novagen).

Para la expresión en mamífero de las proteínas de fusión a GST se introdujeron Rap1 y las distintas mutantes de Rap1 en el pCELF-GST utilizando los sitios BamHI y EcoRI. Los plásmidos pEBG-SrfI-GST-CAP1 (murino) fue gentilmente provistos por el Dr. Pekka Lappalainen (Universidad de Helsinki). El plásmido HA-CAP1 fue provisto por el Dr. J. Field de la University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA. Los plásmidos pCGN-HA-Rap y pCMV-myc-Rap fueron anteriormente descritos [33].

Expresión, purificación y fosforilación *in vivo* de Rap1b

Bacterias *E. coli* BL21(DE3) fueron transformadas químicamente con los vectores de expresión pET28c-Rap1b-G12V o pET28c-Rap1b-G12V. Para llevar a cabo la fosforilación de Rap1b-G12V, se cotransformaron los plásmidos pET28c-Rap1b-G12V y pACYCDuet-1-cPKA, las bacterias cotransformadas fueron seleccionadas en LB (Luria-Bertani) suplementado con Kanamicina y Cloranfenicol. En todos los casos, una colonia recombinante fue inoculada en LB

liquido y crecida a 37°C por 16 horas. Los cultivos fueron diluidos y crecidos hasta alcanzar una densidad óptica a 600nm de 0.6. La expresión de proteína fue inducida mediante la adición de IPTG 1mM, durante 1 hora a 37°C. Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 5000g durante 10 minutos y resuspendidas en buffer de lisis (Tris-HCl 50mM pH 7, NaCl 50mM, MgCl₂ 10mM, benzamidina HCl 1mM, Inhibidores de proteasas (Calbiochem) e inhibidores de fosfatasa (fluoruro de sodio 50mM, orthovanadato de sodio 2mM, benzamidina 1mM y beta-glicerofosfato 1mM)). Las bacterias fueron lisadas incubando con lisozima (1mg/ml), B-mercaptoetanol (5mM), Sarkosyl (1%), Triton X-100 (2%) y sonicación (4x20"). La fracción soluble fue recuperada luego de una centrifugación a 9000 rpm durante 20 minutos a 4°C e incubada con NTA-Ni (Quiagen). La resina fue lavada utilizando Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, MgCl₂ 10mM, imidazol 50mM y B-mercaptoetanol 10mM, mientras que la elución se realizó con buffer conteniendo Tris-HCl 50mM (pH 7), NaCl 150 mM, MgCl₂ 10mM, Imidazol 300mM y B-mercaptoetanol 10mM. El exceso de Imidazol y NaCl fue eliminado por exclusión molecular empleando cartuchos Econo-Pac P6 (BioRad). La proteína fue concentrada y guardada a -80°C en glicerol 25%.

Dicroísmo Circular

Los espectros de las mutantes de Rap1b fueron obtenidos a 25°C en PBS (pH 7.4), en una cuba de cuarzo fusionado de 0.1cm, utilizando un espectrofotómetro AVIV 202 series CD (Lakewood, NJ). Tres espectros en dos experimentos independientes por muestra (Rap1b~10-15uM) fueron obtenidos y promediados, midiendo a intervalos de 1nm en la región de UV lejano (195-280 nm). En todo los casos la línea de base fue corregida, restando el espectro blanco obtenido con PBS en ausencia de proteína. Los espectros están expresados en unidades de elipticidad molar promedio por residuo (θ). Las curvas de temperatura de fusión (TM) fueron obtenidas a partir de 2 mediciones independientes, midiendo (θ) a 220nm entre 25° a 80°C (Rap1b~25uM).

Análisis del nucleótido

El análisis del nucleótido unido a la proteína fue realizado por FPLC, empleando una columna de intercambio aniónico, Mono Q 5/50 GL (GE), en un sistema de purificación AKTA (Pharmacia). Brevemente, la columna fue equilibrada con Tris-HCl 20mM (pH 7.5) y el nucleótido eluido mediante un gradiente de 0 a 250mM NaCl, con un flujo de 1 ml/min. Los tiempos de retención para el GDP y el GTP fueron 14.50 y 19.60 minutos, respectivamente. La preparación de la muestra se llevó a cabo hirviendo una alícuota de la proteína durante 3 minutos a 95°C y centrifugando a alta velocidad durante 10 minutos, con el objeto de remover la proteína desnaturizada. Una alícuota del sobrenadante fue inyectada en la columna, que fuera previamente calibrada con soluciones patrón conteniendo concentraciones crecientes de los diferentes nucleótidos.

Activación de Rap1 utilizando RalGDS-RBD

400µg de lisado proveniente de células PCC13 o 1µg de Rap1b, Rap1b-P o Rap1b-D purificadas a partir de cultivos de *E.coli*, fueron incubados a 4°C por 60 min., con 10µg de GST-RalGDS-RBD pre-conjugados a una resina de glutatión-agarosa (Amersham Biosciences) en 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 50mM, 50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 5mM B-mercaptoetanol). La resina fue lavada 4 veces con buffer de lisis. Luego del ultimo lavado, las muestras fueron resuspendidas en buffer de siembra Laemmli. Las proteínas fueron entonces fraccionadas en un SDS-PAGE al 12% y transferidas a una membrana de polivinildifluoruro (PVDF) para su análisis por Western Blot (WB) . La inmuno reactividad de las proteínas fue luego revelada utilizando anticuerpos primarios correspondientes, y secundarios conjugados a HRP a través de un kit de detección quimioluminiscente (Pierce)

Optimización de las condiciones de fragmentación

Para una eficiente fragmentación se llevó a cabo la optimización de la concentración de Hidrocloruro de Guanidina (GuHCl) a utilizar. Brevemente, 15ul de la solución stock de las mutantes Rap1b (5mg/ml en Tris-HCl 10mM pH 7.0, NaCl 50mM) fueron diluidas con 45ul de

agua y tratadas a 0°C con 90ul de ácido fórmico 0.8% (v/v), conteniendo distintas concentraciones de GuHCl (0.8, 1.6, 3.2, 6.4M), y finalmente congeladas y mantenidas a -80°C para su posterior análisis. Una vez descongeladas sobre hielo, las muestras fueron inmediatamente pasadas por una columna de proteasas conteniendo pepsina porcina inmovilizada sobre una resina Poros AL 20 (30 mg/ml), en presencia de TFA 0.05% en agua, a un flujo de 100 ul/min durante 6 minutos. La duración de la digestión fue de 40 segundos. Los productos de la proteólisis fueron directamente colectados en una columna C18 (Vydac) y eluidos con un gradiente lineal de 8 a 48% B en el transcurso de 30 minutos (Solvente A: TFA 0.05% en agua, y solvente B acetonitrilo 80%(v/v), TFA 0.01%, en agua). El eluido fue transferido a un espectrómetro de masa (Finnigan LCQ Classic) para su análisis espectrométrico, con un ionizador por electrospray (ESI) a un voltaje de 5kV, temperatura capilar de 200°C. La adquisición de datos se llevó a cabo en el modo MS1 (para la cuantificación de deuterio) o MS2 (identificación de péptidos). Para la identificación de la secuencia de los péptidos ionizados generados por la digestión con pepsina, se utilizó el programa SEQUEST (Thermo Finnigan Inc.). Para determinar su eficiencia de marcado, la envoltura isotópica de este set de péptidos fue luego analizada a partir del espectro de masas utilizando software especializado (DXMS Explorer, Serria Analytics Inc, Modesto, CA). Los mapas de cobertura a las distintas concentraciones de GuHCl fueron comparados y la condición en la que se obtuvo la mejor cobertura fue utilizada para los experimentos de intercambio de deuterio.

Intercambio Hidrógeno-Deuterio

Las muestras deuteradas fueron obtenidas a 0°C, diluyendo 15ul del stock de proteína con 45ul de Buffer de Intercambio (Tris-HCl 8.3mM pH 7.2, NaCl 50mM, MgCl₂ 5mM), seguido de una incubación a distintos tiempos (10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 segundos). La reacción fue detenida con 90ul de ácido fórmico 0.8%, conteniendo GuHCl 3.2M a 0°C y congelada a -80°C para su posterior análisis. Las muestras deuteradas fueron analizadas en el aparato de DXMS anteriormente mencionado, junto con muestras control sin deuterar y muestras de Rap1b completamente deuteradas (incubadas a temperatura ambiente, en ácido fórmico 0.5% en D₂O 100%, durante 12 h). Se llevaron a cabo mediciones de las proteínas no deuteradas, parcialmente y completamente deuteradas usando el DXMS Explorer y luego convertidas en niveles de

deuteración considerando las correcciones por el intercambio ocurrido luego de detenida la reacción.

Modelado del extremo C-terminal de Rap1b

Las predicciones se obtuvieron utilizando el Protein Local Optimization Program (PLOOP)[96], diseñado para predecir segmentos faltantes de estructuras cristalográficas de proteínas. El algoritmo utiliza un método jerárquico que involucra la construcción y agrupación de las estructuras del loop, optimización de las cadenas laterales de loops representativos de cada grupo y minimización de la energía. Las evaluaciones energéticas fueron realizadas empleando mecanismos moleculares de campo forzado a nivel atómico (OLPS)[97], a través de un modelo de solvatación de Born [98, 99]. Debido a la longitud del loop C-terminal, se empleó un protocolo jerárquico de 3 pasos. Primeramente, se llevó a cabo la predicción de los residuos 161-172, lo que dio lugar a 30 estructuras posibles que fueron utilizadas posteriormente para la predicción de la estructura de los residuos 170-176. Las 10 estructuras de menor energía de cada predicción de 30 estructuras fueron empleadas como coordinadas iniciales para el último paso de predicción de la estructura de los residuos 176-181. En todos los pasos, se llevó a cabo la optimización de las cadenas laterales dentro de los de 3Å del loop predicho.

Cristalografía

Se realizó un rastreo extensivo de cristalización y las condiciones más prometedoras fueron optimizadas para obtener cristales individuales y de buena difracción. Los datos de la difracción de rayos X, en condiciones crioprotectoras, fueron obtenidos en el SERCAT undulator beamline 22ID del Argonne Advanced Photon Source, Chicago, IL y procesados utilizando HKL2000 [100] y d*TREK [101]. Los datos fueron procesados en grupos espaciales trigonales y hexagonales y la validación del grupo asignado fue verificada por análisis en Scalepack [100] y Phenix [102]. El reemplazo molecular se realizó en Phaser [103], utilizando las coordinadas de Rap1b, obtenidas a partir de la estructura del complejo que forma con RapGAP [95] (PDB accession code 3BRW) en ausencia del ligando. Debido a que la secuencia de Rap1b de este complejo tiene correspondencia a la proteína truncada (residuos 1-167). La estructura del C-terminal, residuos 168-181, fue construida a través de ciclos iterativos de refinamiento y generación de

mapas en Refmac [104]. Arreglos manuales y refinamiento de los residuos alrededor del sitio de unión del GTP- γ -S, C-terminal y las regiones de los switch fueron realizadas utilizando el programa Coot [105].

Cultivos Celulares y transfecciones

La línea de células foliculares de tiroides de rata, PCC13 [106], fue crecida en medio Coon's F-12 modificado (Sigma), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5% y la combinación de 4 hormonas: TSH (1 mIU/ml; IU: unidades internacionales), insulina (1 μ g/ml), transferrina (5 μ g/ml) y hidrocortisona (1 nM). La línea de células embrionarias de riñón humano, HEK 293T, fueron mantenidas en medio de Dulbecco Eagle modificado (DMEM, Cambrex) suplementado con 10% de FBS. Las células fueron mantenidas a 37°C en una atmósfera con una tensión del 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las transfecciones fueron realizadas en placas de 6 pocillos, sobre cultivos con 60-70% de confluencia. En el caso de las células PCC13, las mismas se llevaron a cabo utilizando como agente de transfección el Fugene (Roche Applied Science), ajustando la cantidad de ADN a 1 μ g, según las indicaciones del proveedor. Las transfecciones de células HEK se realizaron con 6 μ de polietilimina (Polysciences, Inc) y 3 μ g de ADN/pocillo. Las células tranfectadas fueron crecidas durante 48hs previo a realizar el tratamiento o ensayo correspondiente.

Ensayo de doble híbrido en levadura

El doble híbrido se realizó utilizando el sistema de doble híbrido Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 y la biblioteca de péptidos de cerebro humano de Clontech. Los insertos correspondientes a Rap1b-G12V-179D y Rap1b-G12V-S179A, obtenidos por restricción a partir del vector pCGN-Rap1b-G12V-179D/A, fueron subclonados para su uso como carnada, en el plásmido pGBKT7, a través de los sitios de restricción NcoI y BamHI. 1,48x10⁷ colonias cotransformates fueron evaluadas utilizando los marcadores: ADE2, HIS3 y lacZ, según las recomendaciones del proveedor (Clontech, Protocolo No PT 3247-1).

Inmunofluorescencia y microscopía

Las células fueron crecidas y tranfectadas sobre cubre-objetos en placas de 6 pocillos. Las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7.4), fijadas con formaldehído 3.7% en PBS a temperatura ambiente por 10 min, permeabilizadas con Triton X-100 por 20 min, e incubadas con glicina 0.1 M en PBS por 10 min. Los cubre-objetos fueron lavados 5 veces durante 5 min con PBS e incubados en PBS conteniendo 1% de albúmina sérica bovina (BSA) por 10 min. Las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente, a temperatura ambiente durante 1h, lavadas 5 veces durante 5 min con PBS conteniendo 1% de BSA e incubadas con anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1h. Luego del ultimo lavado los cubreobjetos fueron montados sobre PermaFluor™ (Thermo) y examinadas por microscopia confocal.

ARN interferente

El efecto de ARN interferente (ARN) se logró a través de la producción de ARN de pequeña horquilla, mediante la introducción del fragmento correspondiente al marco abierto de lectura de CAP1, 5'cac gac att gca aat caa gg 3' (nucleótidos 1074-1092), en el vector pSIREN (Clontech). Para ensayos de cotransfección, se utilizó un exceso de la construcción interferente (2-3 veces mayor respecto del otro vector cotransfectado), para garantizar que todas las células tranfectadas posean esta construcción. Las células fueron cosechadas 60 horas después de la transfección.

Cuantificación de la proliferación por marcado con BrdU

Células crecidas al 50% de confluencia sobre cubre-objetos y tranfectadas con las construcciones indicadas fueron hambreadas por 16 horas en medio Coon's conteniendo BSA 0.2%, previo a la inducción con TSH y 10% FBS. Luego de la estimulación, las células fueron marcadas durante 16 horas con BrdU y fijadas según se describe anteriormente. Las células marcadas fueron identificadas por microscopia de fluorescencia utilizando un anticuerpo primario anti BrdU y un anticuerpo secundario conjugado a Fluoresceína-isotiocianato (FITC, Sigma).

Cuantificación del AMPc intracelular

Células PCCI3 transfectadas con ARNi contra CAP, fueron crecidas en placa de 24 pocillos hasta alcanzar confluencia. Posteriormente, fueron lavadas con Solución salina balanceada de Hanks' sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, e incubadas durante 2 horas en medio fresco con $0.5\mu\text{Ci}$ de ^3H -adenina (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). Las células fueron tratadas con TSH por 30 minutos. La reacción fue detenida con tricloro acético 1.2 M y la posterior neutralización con KOH 4 N. El AMPc fue aislado a través de una cromatografía de 2 columnas [107] y la radioactividad contada en contador de centelleo.

Capítulo I

“Many of life's failures are people who did not realize how close they were to success when they gave up.” ~ Thomas A. Edison

Resultados

Purificación y fosforilación de Rap1b

Con el objeto de estudiar la influencia de la fosforilación dependiente de PKA sobre la estructura de Rap1b, se llevó a cabo la expresión y purificación de la proteína de fusión His-Rap1b a partir de *E. coli*, utilizando construcciones de una mutante de Rap1b constitutivamente activa (G12V) y la misma mutante fosforilada por PKA en S179 (Rap1-P).

La construcción de mutantes fosfomiméticas por sustitución aminoacídica en el sitio de fosforilación, es una estrategia habitual para el estudio de los efectos de la fosforilación sobre la actividad biológica y estructura de una proteína. Residuos que presentan cadenas laterales negativamente cargadas, como el ácido glutámico o aspártico, son potencialmente capaces de imitar los efectos de la fosforilación dependiente quinasa. Para validar el uso de una mutante de fosfomimética de Rap1b como herramienta para dilucidar el papel de la fosforilación en la biología y estructura de Rap1b, se expresó y purificó la mutante fosfomimética G12V-S179D (Rap1-D).

La fosforilación de Rap1 se realizó en *E. coli*, a través de una novedosa estrategia en la que se coexpresaron, en vectores compatibles e independientes, el sustrato (His-G12V Rap1b) y la subunidad catalítica de la quinasa (cPKA). La fosforilación fue confirmada a través de de Western Blot utilizando un antisuero policlonal anti-Fosfo Rap1 (figura 6).

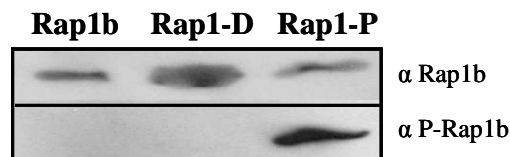


Figura 6. Caracterización de mutantes de Rap1b obtenidas a partir de *E.coli*. WB confirmando la identidad de las proteínas purificadas y su fosforilación, empleando un anticuerpo policlonal anti-Rap1b (Proteintech Group, inc) y un policlonal anti-Rap1b-P (in-house), respectivamente.

Debido a una alta actividad quinasa, producto de la sobre-expresión cPKA en *E. coli*, fue necesario optimizar los tiempos de inducción con IPTG para evitar eventos de fosforilación inespecíficos. La identidad de la proteína fosforilada bajo las condiciones seleccionadas fue caracterizada mediante espectrometría de masa. Para ello, Rap1-P fue tratada con clostripain, una proteasa que digiere enlaces peptídicos del lado carboxilo de una arginina, liberando el péptido C-terminal KKSSGQLL. La masa esperada para el péptido terminal protonado no fosforilado fue 860,52Da. Sin embargo, considerando que la ganancia neta en la masa molecular de un péptido fosforilado es de 80Da, la presencia de un ion de masa molecular de 940.52Da resultó ser un claro candidato a ser el péptido C-terminal fosforilado en S179 o S180. Estudios por MSMS del ion de 940.52 determinaron la presencia de un ion de 842,52Da, originado a partir de la pérdida de 98Da debida a la β -eliminación de un H_3PO_4 (figura 7). Asimismo, la fragmentación por MSMS sugirió que el ion $b_3-H_3PO_4$ correspondería al péptido KKpS, mientras que la presencia de y_5 correspondería al péptido SGQLL sin fosforilar. Estas observaciones confirmaron los resultados obtenidos *in vivo* [108], y fueron una fuerte evidencia que la proteína purificada a partir de cultivos de *E. coli* se encontraba fosforilada en S179.

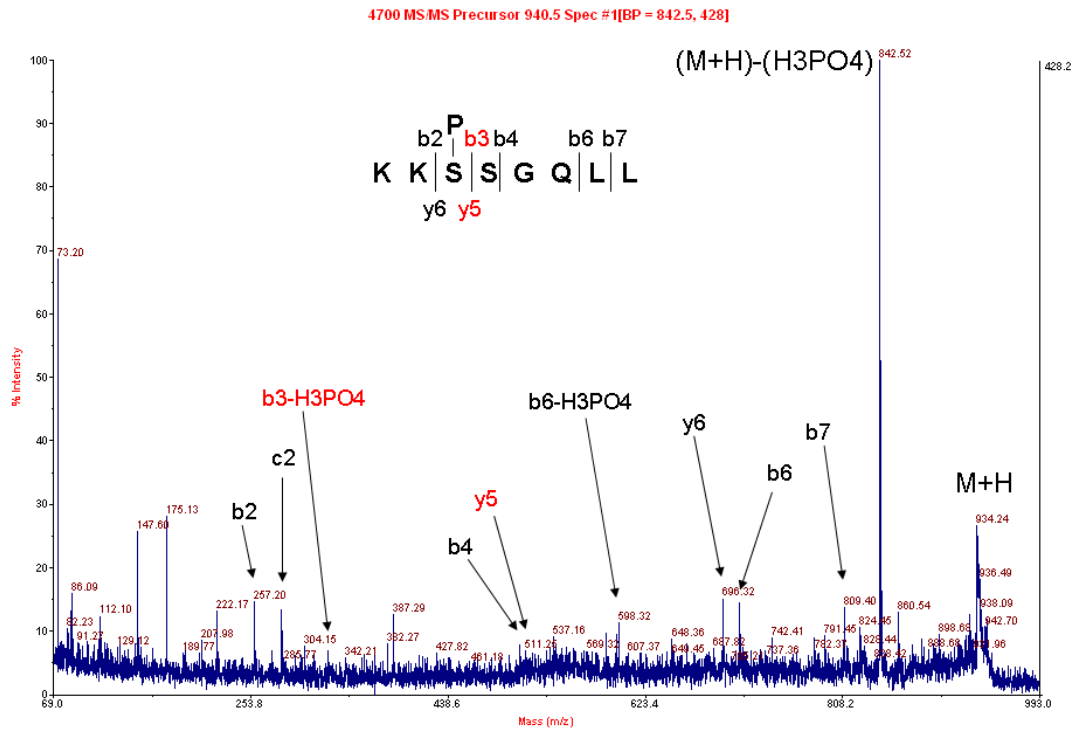


Figura 7. Análisis por fragmentación por MS/MS del ion 940.52 obtenido a partir de la digestión proteolítica de P-Rap1b.

Análisis de la integridad estructural

Durante el proceso de purificación, las proteínas pueden sufrir desnaturalización parcial o total, lo que conduciría a una pérdida de la actividad. Para determinar la integridad estructural y el correcto plegamiento de las proteínas purificadas, se llevaron a cabo ensayos de diroísmo circular, contenido nucleotídico, carga diferencial de nucleótido y ensayos de interacción con efectores.

Dicroísmo Circular

Los espectros de diroísmo circular obtenidos en la región del ultravioleta lejano para Rap1b y Rap1-D, fueron similares y correspondieron a una mezcla de estructuras

alpha y beta (figura 8A). Asimismo, las temperaturas de fusión tampoco presentaron diferencias significativas (figura 8B). De esta forma, el análisis por dicroísmo circular sugirió que la presencia de un residuo fosfomimético no induce modificaciones en la estructura secundaria.

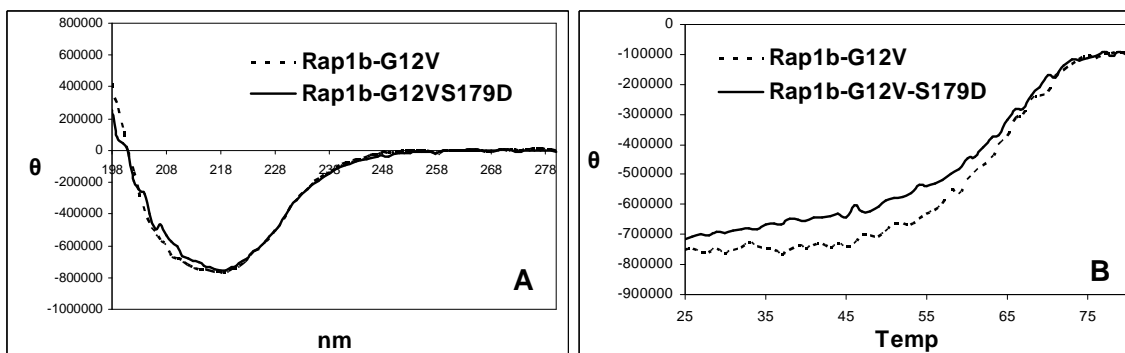


Figura 8. Espectros obtenidos por Dicroísmo Circular para Rap1b y Rap1-D. La estructura secundaria A) y temperatura de fusión B) para Rap1b-G12V y Rap1b-G12V-S179D fueron calculadas por dicroísmo circular y utilizadas para confirmar la integridad proteica y compara potenciales cambios inducidos por la fosforilación sobre la estructura secundaria.

Análisis Nucleotídico

El nucleótido unido a la proteína purificada fue analizado por FPLC. Bajo las condiciones de purificación seleccionadas, el 70-75% de la proteína se encontraba cargada con GTP (figura9).

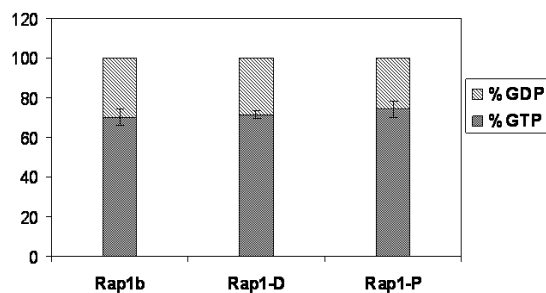


Figura 9. Cuantificación del nucleótido unido a las proteínas purificadas a partir de *E. coli*. Los porcentajes de los nucleótidos unidos en las proteínas purificadas fueron medidos por FPLC.

Ensayo de Activación

Como se mencionara anteriormente, Rap1b alterna entre un estado activado (unido a GTP) y un estado inactivado (dependiente de GDP). Solo en su estado activado, Rap1b posee la capacidad de interactuar con sus efectores, entre ellos RalGDS [109]. Con el objeto de analizar si las proteínas purificadas retienen su capacidad biológica, reflejada en su capacidad de unir *in vitro* GTP o GDP e interactuar diferencialmente con RalGDS, analizando al mismo tiempo el efecto de la fosforilación sobre dicha asociación, se llevaron a cabo ensayos de interacción con el dominio de unión a Rap de RalGDS (RBD), expresado como proteína de fusión a GST.

Como era de esperar, se observó una fuerte interacción entre el GST-RBD y las distintas proteínas cargadas con GTP, sin que se observasen cambios significativos en dicha interacción como producto de la fosforilación. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurriera con Rap1b-G12V, donde solo hay interacción con el RBD en el estado GTP, en el caso de la proteína fosforilada y la fosfomimética se observó una interacción con el RBD aún con la proteína cargada con GDP (figura 10).

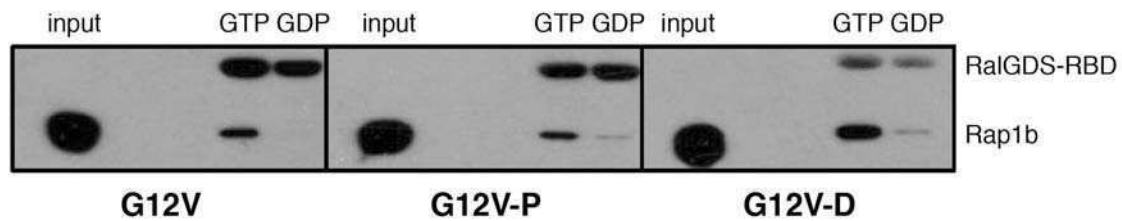


Figura 10. Ensayo de activación de Rap1b. Las propiedades funcionales de las mutantes de Rap1b fueron confirmadas a través de la carga nucleotídica e interacción con el RBD del RalGDS. Para ello se incubaron 1µg de Rap1b, Rap1b-P o Rap1b-D, con 10µg de GST-RalGDS-RBD y precipitados con una resina de glutatión-agarosa. El precipitado fue posteriormente analizado por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra HA y GST.

Activación de Rap1b mediada por PKA

Con el fin de evaluar si el reconocimiento del RBD por la fosfo-Rap1b-GDP no era un artefacto de la purificación de la proteína a partir de bacteria, sino que verdaderamente era una propiedad de la misma, analizamos la activación por fosforilación de Rap1b en células de mamífero. Células HEK 293T fueron cotransfectadas con HA-Rap1b (S179 o S179A) y la subunidad catalítica de PKA (cPKA) o una mutante de Epac constitutivamente activa (Δ Epac). El uso de células HEK nos permitió tener a Rap1 postraduccionalmente modificada e independizarnos de la inducción mediada por el AMPc al transfectar con las mutantes constitutivamente activas de Epac y PKA. Dentro de este marco, Δ Epac fue capaz de activar tanto a la versión salvaje de Rap1b, como a la mutante S179A. Por su lado, la PKA presentó también la capacidad de mediar la activación de Rap1b, pero la misma fue solo observada para el caso de Rap1 salvaje, demostrando que a diferencia de lo que ocurre en el caso de la activación mediada por Epac, la activación dependiente de PKA requiere de la fosforilación en S179 (figura 11).

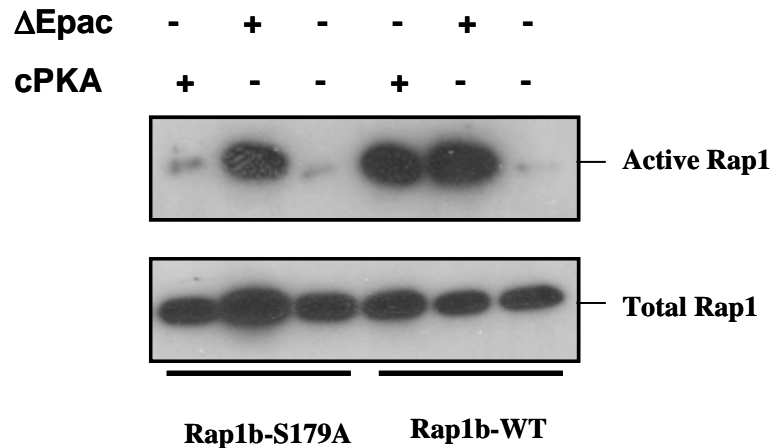


Figura 11. activación de Rap1b mediada por cPKA. células HEK fueron cotransfectadas con HA-Rap1 salvaje o HA-Rap1-S179A, y la subunidad catalítica de PKA (cPKA) o una mutante de Epac constitutivamente activa (Δ Epac). La activación de Rap1 fue medida mediante la precipitación con 10 μ g de GST-RalGDS-RBD pre-unida a una resina de glutatión-agarosa y posteriormente analizadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra HA.

Activación de Rap1b en células de tiroides

Efecto de la inhibición de PKA sobre la cinética de activación de Rap1

Con el objetivo de comprobar la importancia biológica de la fosforilación en S179 sobre la activación de Rap en respuesta al aumento de AMPc, decidimos utilizar un sistema recientemente descrito [86], donde PKA y Epac se encuentran sinérgicamente involucradas en la acción mitogénica mediada por la TSH (hormona estimulante de la tiroides). El análisis de la cinética de activación de Rap1 en una línea de células PCC13 (tiroides de rata), nos permitió observar que durante la inducción con TSH, Rap1 es rápidamente activada y permanece en estado activo al menos por 30 min. No obstante, la inhibición farmacológica de PKA llevó a una activación solo transiente, indicando un potencial rol de PKA en la fase sostenida de la activación dependiente de TSH (figura 12A y B).

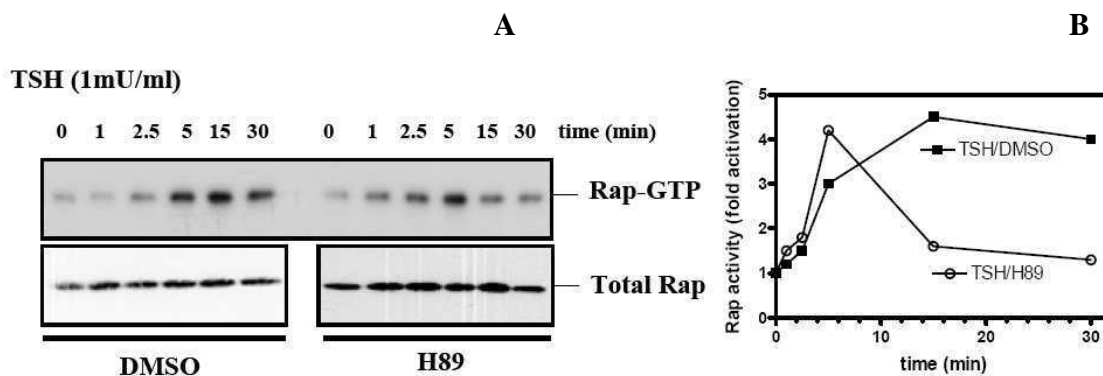


Figura 12. Cinética de activación de Rap1b mediada por TSH. **A)** Células PCCL3 fueron hambreadas por 16 horas medio Coons con 02% BSA, seguido por la estimulación con agonista. La inhibición de PKA se llevó a cabo preincubando los cultivos celulares durante 20 minutos con H89 (10 μ M) o DMSO como control. La incubación con TSH se realizó a los tiempos indicados. Las células fueron lisadas y la activación de Rap se midió a través la precipitación con 10 μ g de GST-RalGDS-RBD pre-unida a una resina de glutatión-agarosa y posteriormente analizadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra HA. **B)** Cuantificación de los resultados vistos por Western Blot y normalizados contra la expresión total de Rap1b.

Efecto de la activación selectiva de PKA sobre la activación de Rap1b

Para determinar si la fosforilación de Rap resultaba suficiente para reproducir los efectos de la fase sostenida de la activación mediada por TSH, se utilizó un análogo del AMPc capaz de activar, específica y exclusivamente, la vía dependiente de PKA. Este análogo logró restablecer la componente sensible a H89, demostrando una cinética de activación de Rap consistente a la fase sostenida observada anteriormente (figura 13).

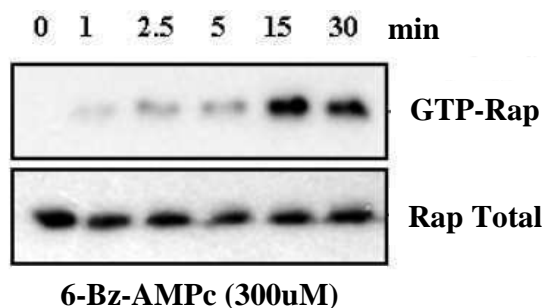


Figura 13. activación de Rap1b por PKA en células de tiroides. células PCCL3 fueron hambreadas por 16 horas medio Coons/02% BSA seguido por la estimulación con el análogo de AMPc específico de PKA, (6-Bz-AMPC, 300 μ M). Las células fueron lisadas y la activación de Rap se midió a través la precipitación con 10 μ g de GST-RalGDS-RBD pre-unida a una resina de glutatión-agarosa y posteriormente analizadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra HA.

Estos resultados indicarían que la capacidad de PKA de inducir la activación de Rap depende estrictamente de la fosforilación en S179. Como consecuencia de ello, podemos hipotetizar que una modificación en el extremo C-terminal de Rap1b estaría siendo transmitida al dominio efector ubicado en el extremo N-terminal, denotando la existencia de un efecto alostérico de la fosforilación sobre el dominio de reconocimiento de efectores.

Para comprobar esta hipótesis y analizar los posibles cambios conformacionales inducidos por la fosforilación en S179 sobre el dominio efector, se utilizó el intercambio hidrógeno/deuterio (H/D) asociado a espectrometría de masa (DXMS).

Fragmentación proteolítica de Rap1b

La espectrometría de masa como herramienta para la identificación regiones dentro de una proteína que presenten intercambio diferencial hidrógeno/deuterio depende estrictamente de la capacidad de fragmentar la proteína y generar mapas peptídicos que cubran la mayor parte de la secuencia proteica. Las condiciones óptimas de fragmentación fueron determinadas digiriendo la Rap1b dentro una columna de pepsina en presencia de distintas concentraciones de un agente desnaturizante (GuHCl). El producto de proteólisis fue colectado por fase reversa utilizando una columna C-18 y los péptidos resultantes analizados por MS. El mejor mapa peptídico de Rap1b, con 43 péptidos y 98% de cobertura de la secuencia, se obtuvo a una concentración final de GuHCl de 2M (figura 14).

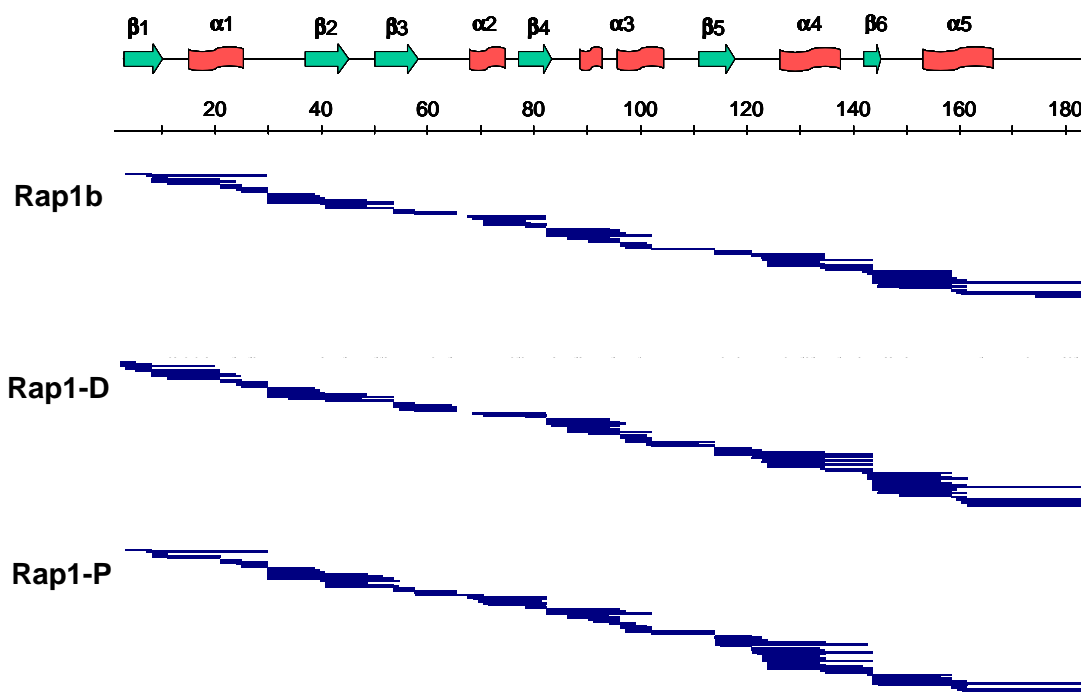


Figura 14. Mapa de digestión con pepsina de Rap1b en presencia de una concentración final de GuHCl 2M. El mapa de digestión óptimo fue obtenido en columna de pepsina en presencia de GuHCl 2M. Los péptidos fueron colectados por fase reversa y posteriormente analizados por MS.

DXMS

El DXMS es una técnica de gran sensibilidad que permite identificar cambios estructurales y la dinámica que acompañan a las modificaciones conformacionales de una proteína [108]. Mediante esta técnica se monitorea el intercambio de hidrógenos amida en el esqueleto de la proteína por el isótopo pesado del hidrógeno, el deuterio, presente en el solvente de intercambio. Este intercambio H/D, que resulta en un aumento en la masa del péptido, solo se lleva a cabo si el hidrógeno se encuentra completamente expuesto. Mientras que los hidrógenos unidos covalentemente a átomos de carbono no intercambian, aquellos hidrógenos involucrados en uniones puente de hidrógeno u ocultos dentro de la proteína, presentan una velocidad de intercambio muy lenta y los hidrógenos presentes en loops flexibles expuestos al solvente, exhibe generalmente una alta velocidad de intercambio que los hace indetectables. De esta forma, los hidrógenos amida de las uniones peptídicas fueron utilizados como sensores de la accesibilidad de cada residuo al solvente acuoso y su velocidad del intercambio H/D una evidencia de los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación en S179 (figura 15).

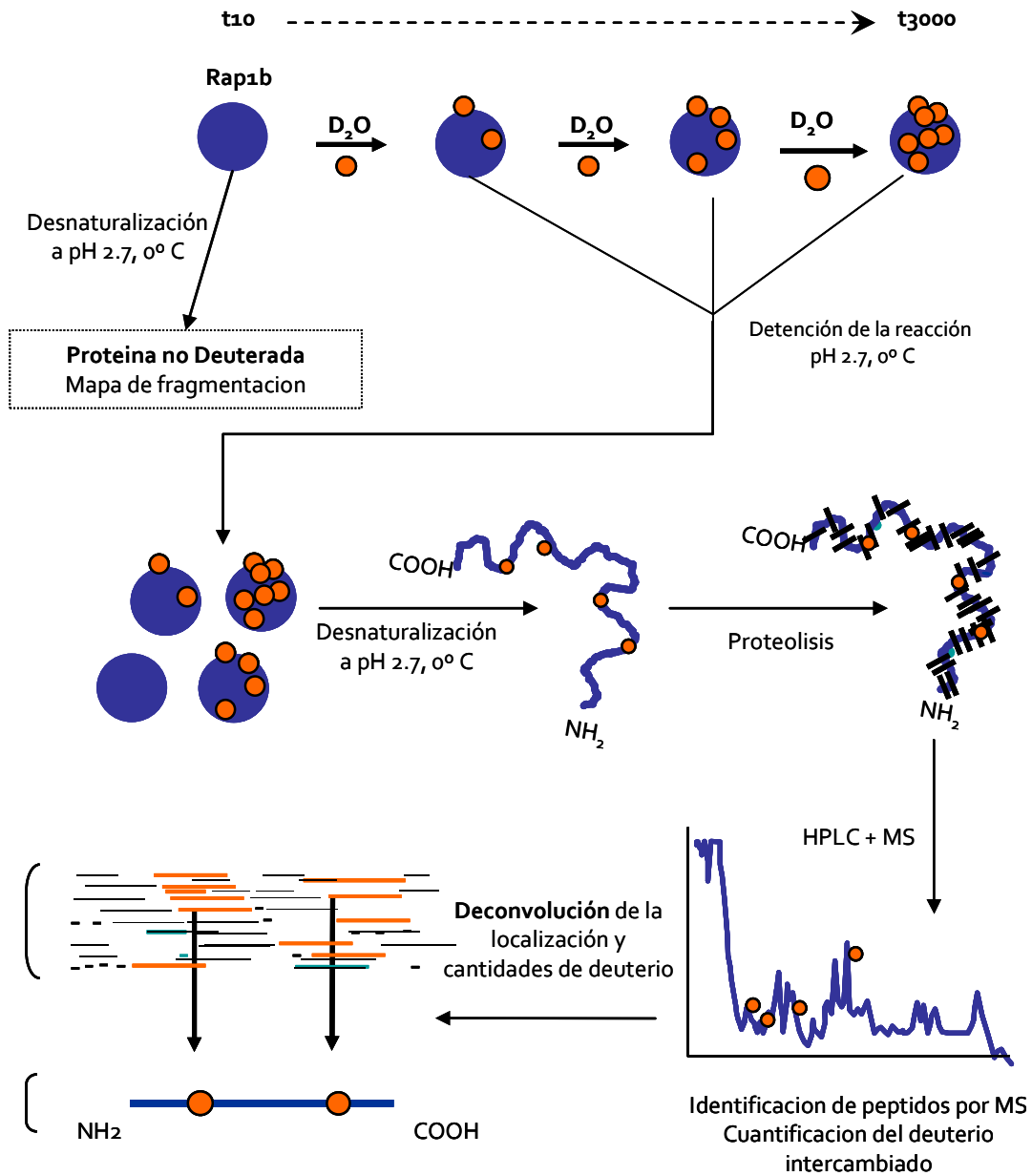
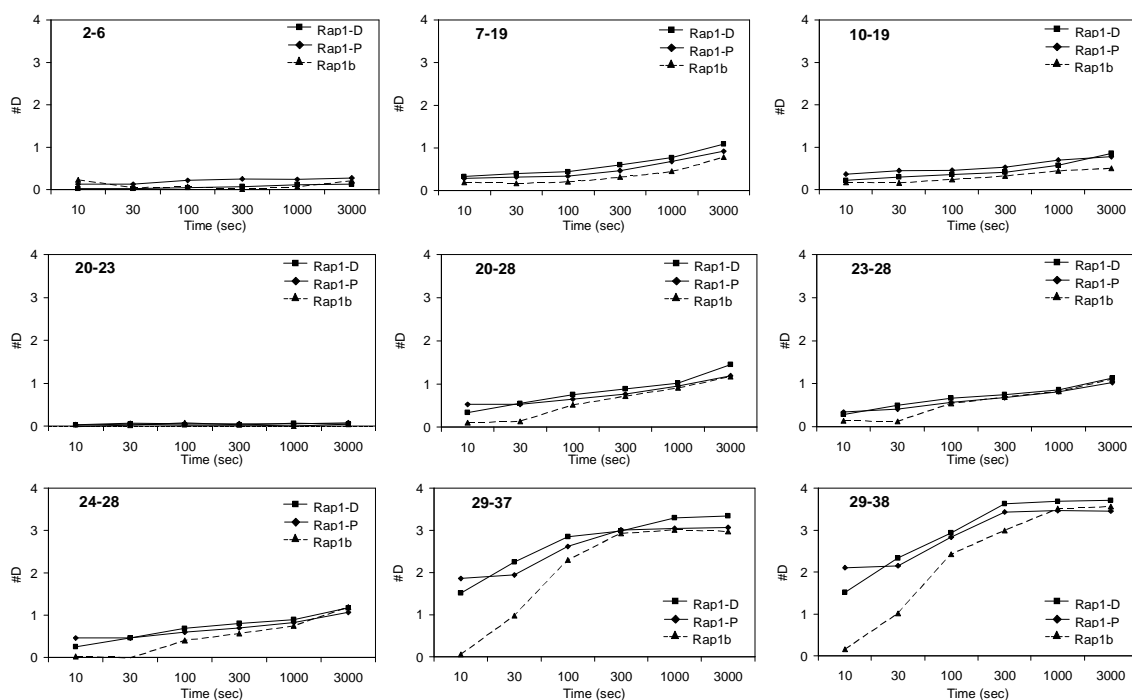
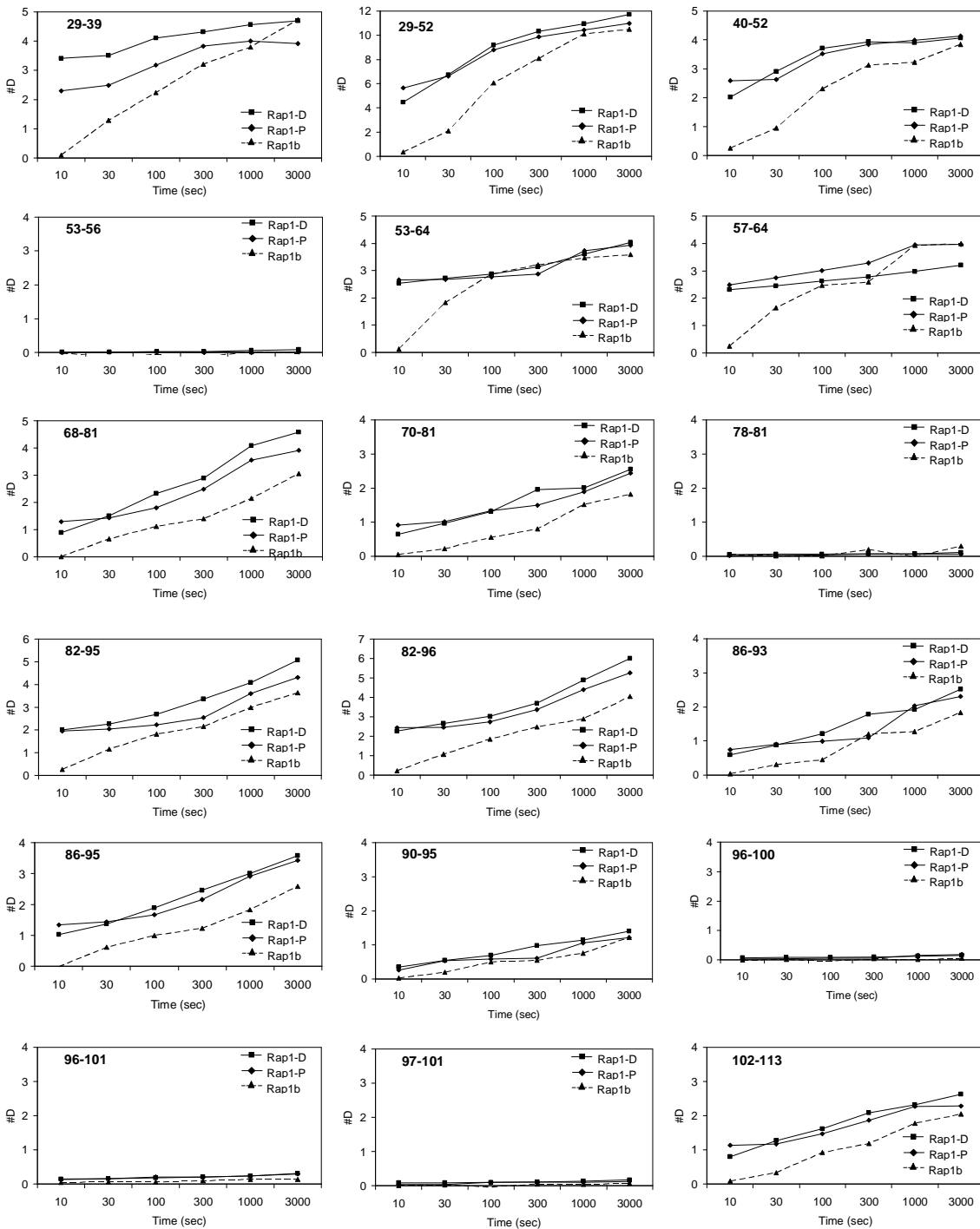


Figura 15. Protocolo de preparación de muestras para análisis por DXMS. Los mapas de fragmentación se llevaron a cabo con la proteína sin deuterar. El intercambio se realizó deteniendo la reacción en condiciones ácidas a distintos tiempos. Las proteínas fueron desnaturalizadas y sometidas a proteólisis. Los péptidos y la cuantificación de deuterio se hizo a través de HPLC y MS.

Los ensayos de DXMS se realizaron utilizando G12V (Rap1b), G12V fosforilada (Rap1-P) y Rap1-D. El intercambio de deuterio fue monitoreado en función del tiempo y la reacción rápidamente detenida en condiciones acídicas, para ser luego digerida y analizada por MS. El perfil cinético de los péptidos analizados (figura 16) demostró que la fosforilación indujo un aumento en la incorporación de deuterio en todas las regiones que presentaron intercambio diferencial y que Rap1-P y Rap1-D presentan un intercambio casi idéntico, hecho que valida la utilización de ésta última como mutante fosfomimética.





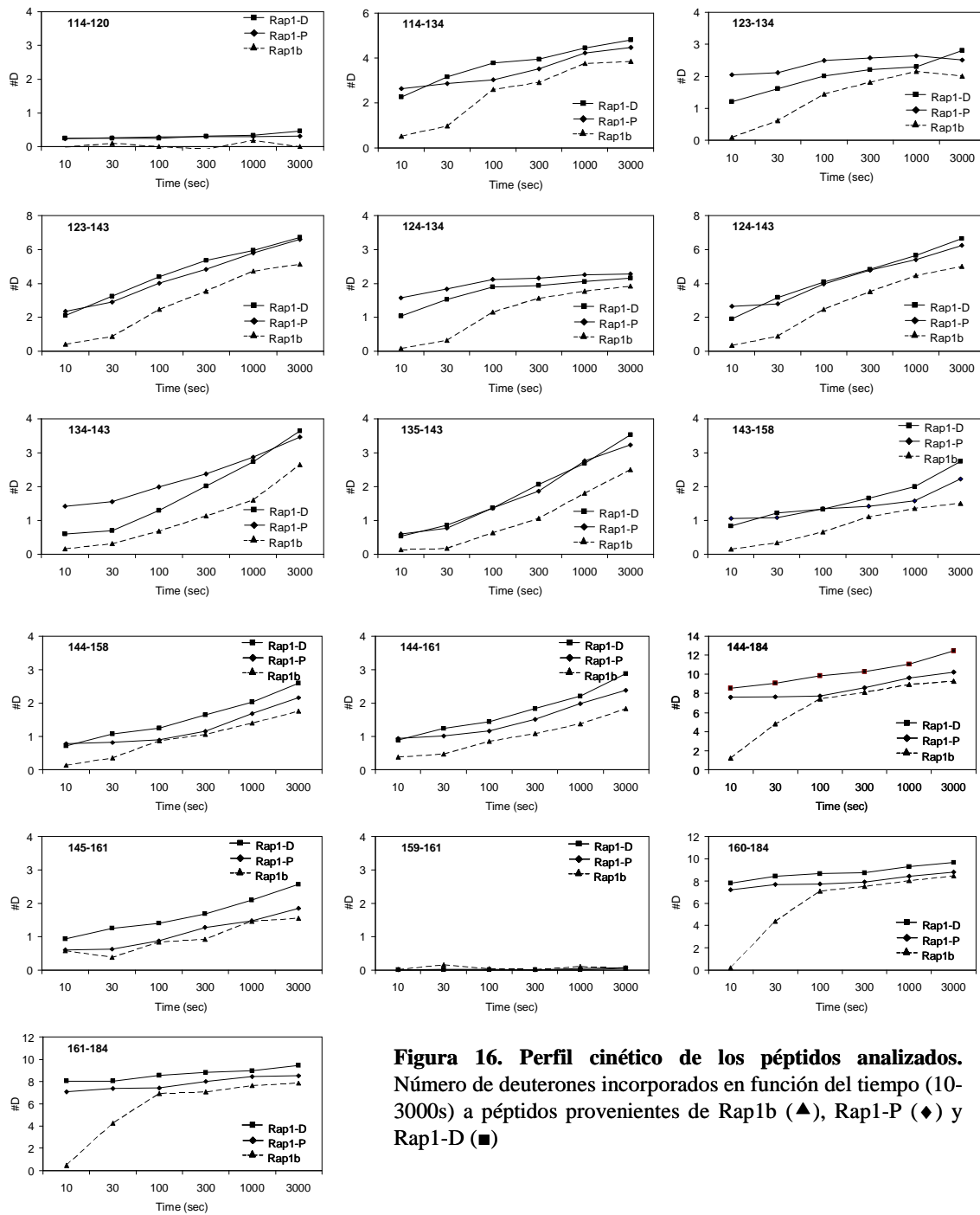
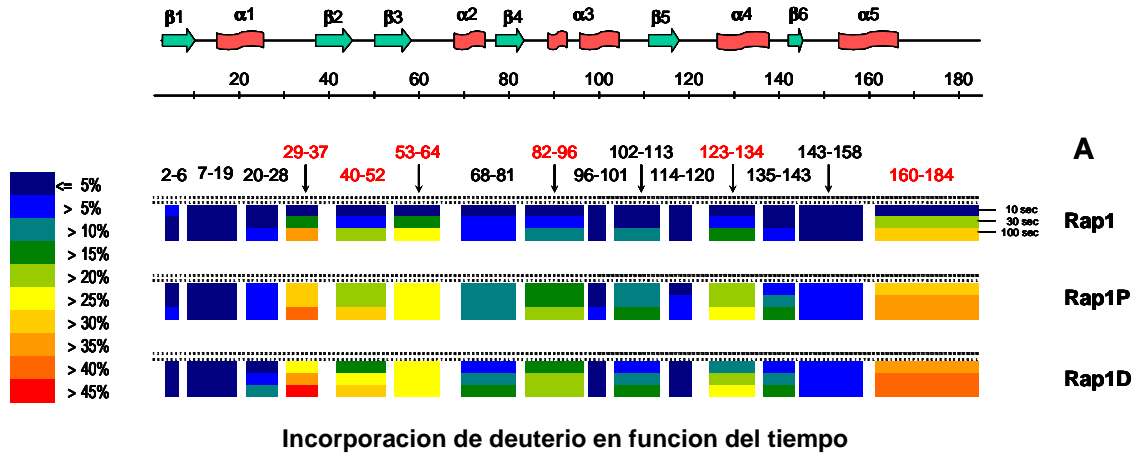


Figura 16. Perfil cinético de los péptidos analizados. Número de deuterones incorporados en función del tiempo (10-3000s) a péptidos provenientes de Rap1b (▲), Rap1-P (◆) y Rap1-D (■)

Los péptidos que presentaron diferencias significativas en la incorporación de deuterio entre el estado fosforilado y no fosforilado, se encontraron distribuidos en regiones discretas dentro de la proteína. El fragmento C-terminal 160-184 (incluye el $\alpha 5$ y la región hipervariable), parcialmente inaccesible en la forma no fosforilada, mostró un intercambio rápido en el estado fosforilado. Sorprendentemente, los loops flexibles correspondientes al switch I (32-40, $\alpha 1$ - $\beta 2$ loop) y al switch II (60-76, $\beta 3$ - $\alpha 2$ loop y $\alpha 2$) presentaron un intercambio mayor como consecuencia de la fosforilación, según fuera puesto en evidencia por los péptidos 29-37 y 53-64, respectivamente. De manera similar, otras cuatro regiones de la proteína representadas por los péptidos 40-52 ($\beta 2$ y $\beta 2$ - $\beta 3$ loop), 83-96 ($\beta 4$ - $\alpha 3$ loop y $\alpha 3$), 102-113 ($\alpha 3$ - $\beta 5$ loop) y 123-134 ($\beta 5$ - $\alpha 4$ loop y $\alpha 4$), mostraron cambios conformacionales inducidos por la fosforilación (figura 17A).

El gráfico en la figura 17B, muestra las diferencias en la incorporación de deuterio encontradas entre Rap1-P/Rap1-D y Rap1 a los 10 segundos de iniciada la reacción. Como fuera mencionado, los perfiles para Rap1-D y Rap1-P resultaron ser idénticos y en general, se observó un mayor intercambio para la proteína fosforilada y la fosfomimética, que para la proteína sin fosforilar.

Debido a que las estructuras de Rap1 disponibles han sido resueltas a partir de la proteína truncada, la cual no posee el fragmento C-terminal (residuos 167-184), y como consecuencia de ello tampoco el sitio de fosforilación (S179), las principales diferencias en el intercambio fueron mapeadas en la estructura cristalina de Rap1a unida al GppNHp [18](figura 18).



Incorporación de deuterio en función del tiempo

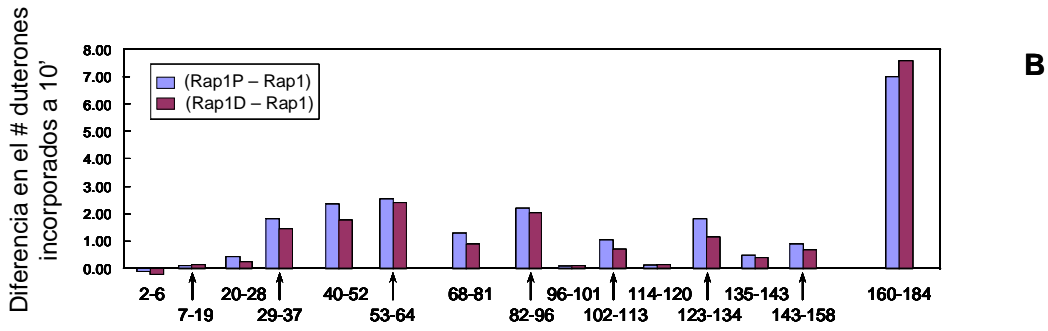


Figura 17. Resumen del intercambio hidrógeno/deuterio inducido por la fosforilación. A) Estructura secundaria de Rap1b, sobre el porcentaje de incorporación de deuterio en el tiempo (10, 30, 300s) en una escala de colores para péptidos representativos. B) Diferencia en el número de deuterones a los 10s entre G12V-S179D (Rap1D) o G12V fosforilada (Rap1P), y G12V (Rap1b).

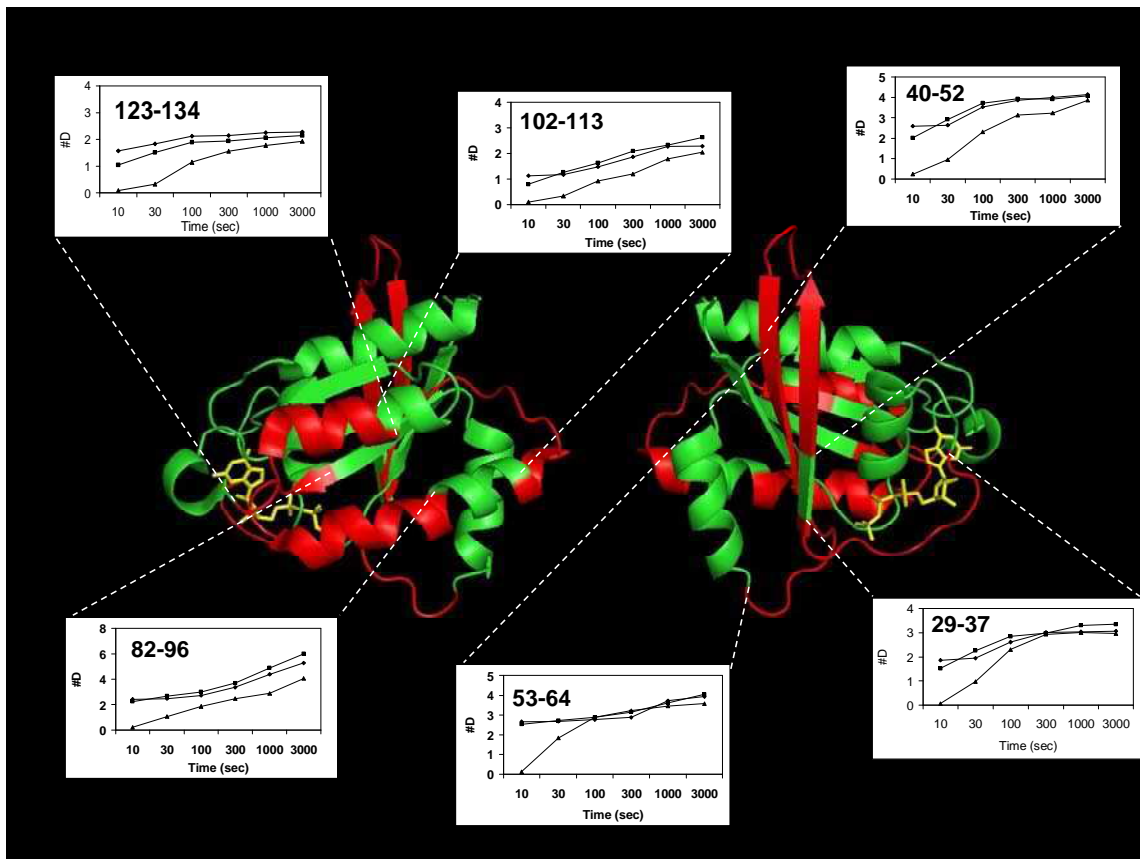


Figura 18. Mapeo de regiones de alto intercambio H/D inducido por fosforilación. Los péptidos que mostraron la mayor diferencia en el intercambio fueron mapeados y sus perfiles cinéticos (10-3000s) mostrados sobre la estructura de Rap1a (1-166)-GppNHp (La estructura de Rap1a en verde, los péptidos correspondientes en rojo y el nucleótido en amarillo). En la figura originada en PyMol, se visualiza de izquierda a derecha una rotación de 180°C.

La carencia de una estructura de Rap1b completa nos llevó a comparar los cambios observados en el intercambio H/D a través de conformeros de baja energía de estructura conocida. Estructuras del extremo C-terminal fueron modeladas a partir de algoritmos de predicción jerárquicos que involucraron la construcción y agrupación de las estructuras del loop, optimización de cadenas laterales y minimización de la energía.

En base a simulaciones, se demostró que el extremo C-terminal de K-Ras (muy similar en secuencia al extremo C-terminal de Rap1b) toma una conformación tal que la sección media del loop C-terminal se posiciona cerca del la región de giro $\beta 2$ - $\beta 3$ (Gorfe et al, resultados no publicados). Nos planteamos, entonces, la posibilidad que el extremo C-

terminal de Rap1b interactúe con la misma región de la proteína. La figura 19 muestra una colección de estructuras de baja energía, donde cargas positivas presentes en el C-terminal de Rap1b se posicionan dentro de los 5-8Å de los residuos negativamente cargados E45 y D47, en el giro β 2- β 3. De acuerdo con este modelo, el dominio polibásico en el extremo C-terminal interactuaría dinámicamente con la región cargada negativamente en el giro β 2- β 3 (I.e. E45, D47). La fosforilación en S179, vecina a la región polibásica, incorporaría una carga negativa repulsiva que aumentaría la flexibilidad del giro β 2- β 3, que podría ser transmitido al switch I y al switch II a través de β 2 y β 3 respectivamente.

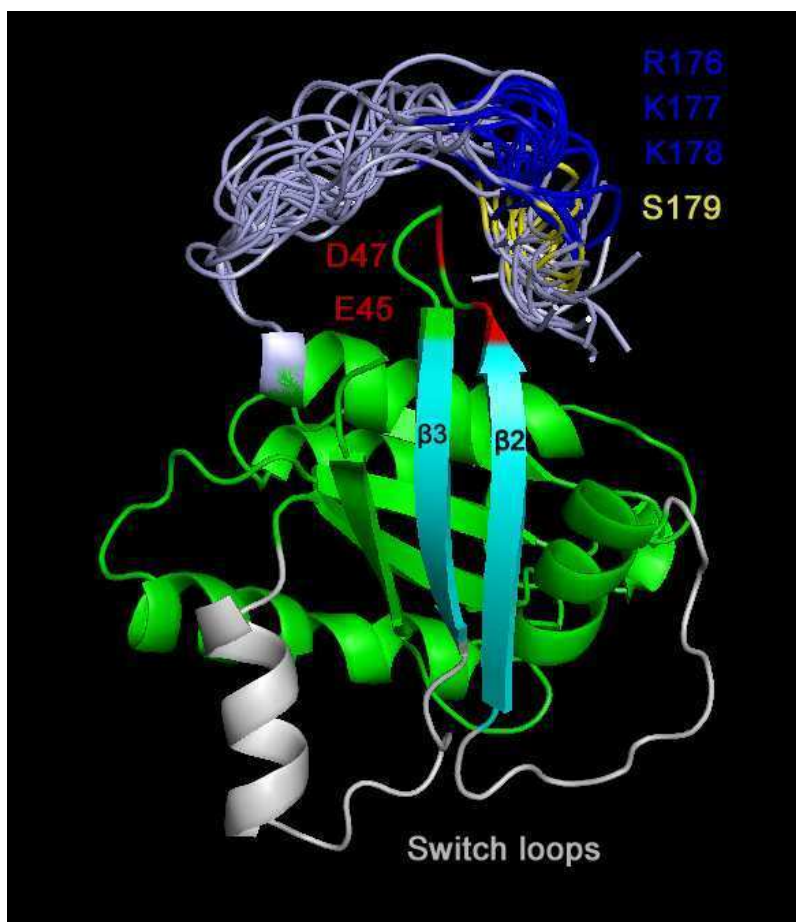


Figura 19. Modelo propuesto para el efecto alostérico inducido por fosforilación. El modelado de las conformaciones del C-terminal (plateado) se realizó como una extensión de la estructura publicada de Rap1a (verde), donde se destacan la región polibásica (azul) y el sitio de fosforilación (amarillo). Se indican además, los potenciales sitios de interacción electrostática entre la región polibásica y los residuos acídicos E45/D47 (rojo), y se visualiza la conexión entre las cadenas β 2- β 3 (celeste) y los switch I y II (gris).

En un intento de expandir el modelo presentado en la figura 16, se llevó a cabo el modelado de Rap1b en su estado fosforilado. En este caso, debido a la ausencia de restricciones, el espacio conformacional resultó ser demasiado grande como para asignar especial significancia a una estructura en particular. Aún así, consistentemente con nuestro modelo, se puede concluir a partir de todas las estructuras obtenidas que el residuo fosforilado y cargado negativamente, interactuaría con cargas positivas de residuos presentes en la región polibásica u otra parte de la proteína, alterando directa o indirectamente la interacción con el loop $\beta 2$ - $\beta 3$. Ejemplos de estas estructuras son presentados en la figura 20.

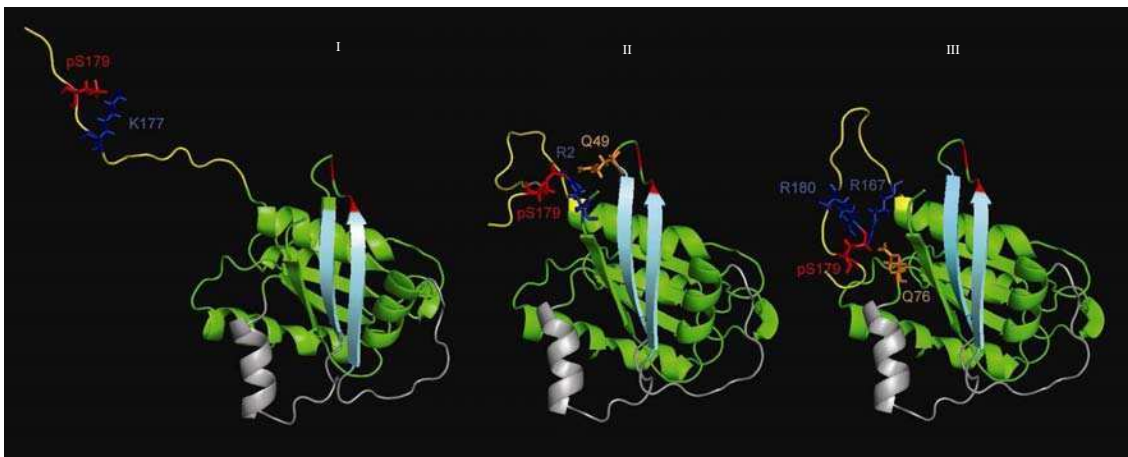
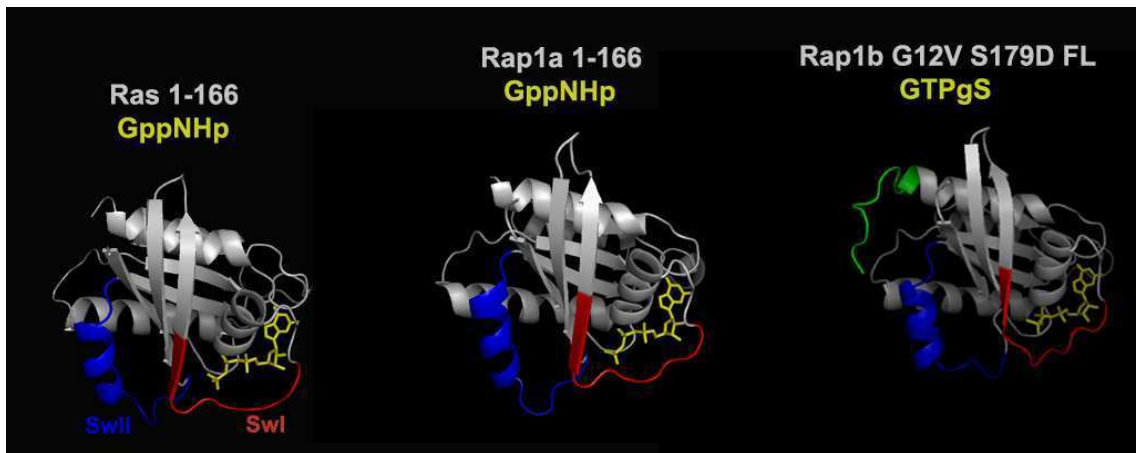


Figura 20. Modelado sin restricciones de la estructura de Rap1b fosforilada. El modelado se realizó como una extensión de la estructura publicada de Rap1a (verde). Se destacan los Switch I y II (gris), cadenas $\beta 2$ - $\beta 3$ (celeste), el C-terminal modelado (amarillo), los residuos del loop $\beta 2$ - $\beta 3$ cargados negativamente (rojo), el pS179 (rojo), residuos positivos (azul) y estabilizadores (naranja). En todos los casos el pS179, de carga negativa, interactúa con residuos cargados positivamente. Ejemplos de estas interacciones son la interacción con la región polibásica (K177, derecha) u otras partes de la proteína (R2, medio, y R167/R180, derecha).

Estructura Cristalográfica de Rap1b

Un primer paso para la confirmación del modelo obtenido, fue la obtención de cristales y la resolución de la estructura de la versión de tamaño completo de Rap1b-G12V-S179D (Rap1-D). En la figura 21A, comparamos las estructuras conocidas de Ras, Rap1a y la recién obtenida para Rap1-D. A diferencia de las estructuras de Ras y Rap1a, la estructura de Rap1b no fue resuelta a partir de un complejo con otra proteína, sino que a partir de Rap1b por sí sola. Como resultado de la estructura obtenida para Rap1b, puede comprobarse que el modelo III de la figura 20A era el que más se aproxima a la ubicación espacial presentada por el C-terminal (verde) de la mutante fosfomimética de Rap. Además, puede observarse que a diferencia de lo que ocurre normalmente para el resto de las proteínas G de la familia, donde T35 del switch I y G60 ubicada en el switch II interactúan con el fosfato γ del GTP, en el caso de Rap1-D la interacción del nucleótido con T35 y G60 se pierde. En su lugar el fosfato γ forma nuevos contactos con D33 y P34, mientras que el switch II ya no contacta al GTP (figura 21B).

A



B

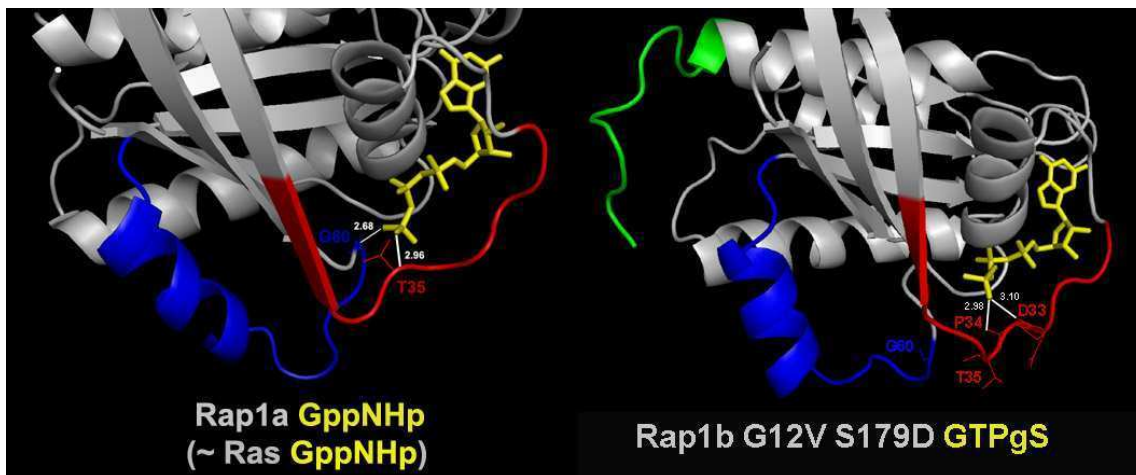


Figura 21. Estructuras conocidas de Rap1b. **A)** De izquierda a derecha, estructuras de Ras, Rap1a y Rap1b, respectivamente. Se indican el análogo de AMPc utilizado (amarillo) y los switch I y II (rojo y azul, respectivamente) y el fragmento C-terminal, ausente en Ras y Rap1a. **B)** Ampliación de la imagen en A, mostrando el detalle de los nucleótidos que interaccionan con el AMPc.

Discusión

La fosforilación puede llevar a la activación o inhibición de una actividad enzimática, induciendo cambios conformacionales que modifiquen el reconocimiento de efectores o creando nuevas superficies de interacción con efectores. En el caso particular de Rap1, la fosforilación no afecta su localización intracelular general (datos propios no mostrados), los valores basales de intercambio GDP/GTP, la velocidad intrínseca de degradación de GTP o su habilidad de ser estimulada por una Rap-GAP citosólica [88]. Sin embargo, evidencias del rol regulatorio de la fosforilación de Rap1 han sido descritas para Citocromo b558 [92] y Raf-1 [93]. En estos casos, la fosforilación modula negativamente la habilidad de Rap1 de asociarse a estas proteínas. No obstante, es todavía hoy una incógnita el papel que juega la fosforilación de la S179 y la influencia de la misma sobre la región de reconocimiento de efectores ubicada en el extremo N-terminal.

Como primera medida, a fin de analizar los cambios conformacionales inducidos por la fosforilación dependiente de PKA sobre la conformación de Rap1b, se expresaron y purificaron, a partir de *E. coli*, las versiones fosforilada (Rap1-P), fosfomimética (S179D, Rap1-D) y no fosforilada (Rap1b) de Rap1. La fosforilación de Rap1b fue obtenida a través de una novedosa técnica de cotransformación de quinasa y sustrato (cPKA y Rap1b, respectivamente) y confirmada por WB y MS. La ausencia de cambios significativos en las estructuras secundarias de las proteínas purificadas fueron demostrados por difracción circular. Ensayos de activación fueron utilizados para comprobar el correcto plegamiento de las proteínas purificadas y la retención de su función biológica, evidenciada a través de su capacidad de poder ser cargadas *in vitro* con GTP o GDP e interactuar específicamente con el RBD de RalGDS. Estos ensayos permitieron comprobar también que las diferencias observadas entre las proteínas fosforiladas y no fosforiladas en el intercambio H/D no se debieron a un plegamiento diferencial, ni a una desnaturalización parcial o total de las mismas.

La capacidad de interacción con el GST-RBD que demostraron las proteínas fosforiladas y fosfomiméticas en su conformación inactivada, así como la capacidad de PKA de inducir la activación de Rap1 dependiendo estrictamente del estado de

fosforilación de la misma, son observaciones consistentes con un efecto alostérico de la fosforilación sobre el dominio efector de Rap1.

Con el objeto de disectar el posible efecto alostérico desde el punto de vista estructural, se analizaron a través del DXMS los cambios en la accesibilidad al solvente inducidos por la fosforilación de Rap1b, considerando que estos cambios estarían reflejando la exposición de regiones originalmente ocultas en la proteína sin fosforilar.

Como era previsible, Rap1b presentó una alta incorporación de deuterio en las regiones flexibles correspondientes a los switch I y II, mientras que las regiones involucradas en el anclaje del nucleótido (loop P residuos 10-17) y los residuos 116-119 y 147-149, que interaccionan con la base del nucleótido, se encuentran ocultos en regiones menos flexibles. P-Rap1b presentó un intercambio aumentado en regiones discretas dentro de la proteína, como lo fue el caso del dominio efector y el extremo C-terminal. La mutante fosfomimética Rap1-D, exhibió una cinética de incorporación de deuterio idéntica a la de Rap1-P, confirmando las suposiciones funcionales desde el punto de vista conformacional.

El hecho que cambios conformacionales inducidos por la fosforilación en el extremo C-terminal sean acompañados por cambios en el dominio efector, es compatible con un efecto alostérico de la fosforilación sobre este dominio. Aún así, vista la importancia estructural del extremo C-terminal de una pequeña GTPasa como un novel elemento de reconocimiento para la interacción con efectores [110] y la rápida exposición que observamos para el C-terminal de Rap1 en el estado fosforilado, podría además considerarse la existencia de un dominio de unión a efectores en el extremo C-terminal de Rap1b, regulado por la fosforilación en S179. Por otra parte, es sabido que Ras es capaz de activar distintas vías de señalización según su localización subcelular y, que en el caso de K-Ras, la fosforilación por PKC en S181 es capaz de modular su compartimentalización [111]. Nuestros resultados demostraron que la fosforilación de Rap1 indujo un aumento en la incorporación de deuterio en distintas regiones a lo largo de la proteína; No podemos descartar entonces, que alguna de estas regiones expuestas diferencialmente al solvente en el estado fosforilado, no solo este involucrada en la comunicación entre el C-terminal y los loops de interacción con efectores, sino que además sea una nueva superficie de contacto para efectores. En este sentido, se ha identificado un pequeño dominio de Rap1

(residuos 85-89), implicado en la localización subcelular [112]. Este dominio, coincide con una de las regiones en las que observamos mayor intercambio H/D, el péptido 82-96, con lo cual podríamos razonar que el receptor para este dominio, podría ser sensible a regulación por fosforilación y de este modo dirija la localización subcelular de un pool de Rap1.

El modelo teórico de la estructura de Rap1b fue consistente con nuestros resultados experimentales, donde el péptido C-terminal (conteniendo la región polibásica y el sitio de fosforilación), péptidos 29-37 (switch I), 53-64 (switch II) y 40-52 (conteniendo el giro negativamente cargado $\beta 2$ - $\beta 3$) representaron las regiones de mayor intercambio H/D como resultado de la fosforilación. Es importante destacar, también en conformidad con este modelo, que simulaciones dinámicas con Ras sugieren la existencia de una isoforma específica que presenta una interconexión entre el C-terminal y el giro $\beta 2$ - $\beta 3$, que afectaría alostericamente los dominios de unión al nucleótido y el dominio efector [113, 114]. Sumado a ello, la sustitución en K-Ras de los residuos negativamente cargados (I.e., residuos D47 y E49) controlan la orientación de Ras en la membrana y la señalización [115].

En un intento de expandir el modelo propuesto para Rap1b, se elaboro un modelo de Rap1b en su estado fosforilado. Si bien la falta de restricciones en el espacio conformacional resultó ser demasiado grande como para asignar especial importancia a una estructura en particular, se puede concluir a partir de todas las estructuras obtenidas que el residuo fosforilado y cargado negativamente, interactuaría con cargas positivas de residuos presentes en la región polibásica u otra parte de la proteína, alterando directa o indirectamente la interacción con el loop $\beta 2$ - $\beta 3$.

La posterior resolución de una estructura cristalina de Rap1-D, nos permitió comprobar que se pierde la interacción entre el GTP y los residuos T35 del switch I y G60 del switch II. Se crean en este caso nuevos contactos entre el fosfato γ del GTP con D33 y P34, mientras que el switch II ya no contacta al nucleótido. Esto último podría deberse a que la disposición espacial del C-terminal de la proteína fosfomimética no sea exactamente la prevista por modelo, por lo que no sería a través del loop $\beta 2$ - $\beta 3$ que afecta alostericamente al loop efector, sino que sería directamente a través de la interacción con el switch II. La resolución de la estructura de la mutante no fosforilable y ensayos de

mutagénesis de los posibles residuos involucrados serán una herramienta de fundamental importancia para develar el mecanismo implicado.

Una conexión entre el dominio de unión del nucleótido y la región de anclaje a la membrana en el C-terminal fue originalmente propuesta en Ras para explicar la segregación lateral dependiente de GTP en la membrana plasmática [116]. Las proteínas Ras no se encuentran homogéneamente distribuidas en las distintas membranas, sino que existe una fracción fija de Ras-GTP (~40%) en la membrana plasmática, la cual se encuentra organizada en nanoclusters compuesto de 7 moléculas de Ras formando un complejo inmóvil, mientras que el 60% restante representa la fracción monomérica, soluble y móvil de Ras [117]. El ensamblado de los nanoclusters de Ras es imprescindible para el reclutamiento de efectores y la eficiente señalización [118-120]. Significativamente, la fosforilación de la S181 de K-Ras, vecina al dominio polibásico C-terminal, tiene un efecto negativo sobre la formación del cluster e indirectamente sobre el reclutamiento de efectores. Sorprendentemente, sin embargo, la fosforilación de K-Ras ha demostrado tener un efecto positivo en la señalización [119]. Sumado a ello, la fosforilación mediada por PKC en S181 de K-Ras provoca la translocación de pK-Ras de la membrana plasmática a endomembranas, incluyendo mitocondria, donde por interacción con BcKL dispara una respuesta apoptótica [121]. Asumiendo una dependencia alostérica similar en K-Ras, nuestros resultados sugerirían que la fosforilación podría tener efectos directos sobre la interacción con efectores, potencialmente, aún en ausencia de nanoclusters.

Durante mucho tiempo ha sido considerado que el ciclo de las GTPasas representaba un simple switch conformacional entre 2 estados. Sin embargo, es cada día mas claro que aún en sus estados nativos (unido a GTP o GDP) debe considerarse la existencia de un conjunto múltiple de conformaciones con distintas velocidades de intercambio [113, 122-125]. La unión del efector seleccionaría uno de estos conformeros pre-existentes, desplazando así el equilibrio. Nuestros resultados sugieren la posibilidad que la fosforilación esté directamente “fijando” un estado conformacional, o que indirectamente alterando las velocidades de intercambio, actúe como un discriminador alostérico de los estados conformacionales, i.e. un switch dependiente de fosforilación que este actuando en paralelo al switch canónico dependiente de nucleótido.

Como consecuencia de estas observaciones, el próximo objetivo fue la identificación nuevos efectores de Rap1b, que presenten en su accionar una dependencia de la fosforilación en la S179 de Rap1b.

Capítulo II

“A theory is something nobody believes, except the person who made it. An experiment is something everybody believes, except the person who made it.”. Albert Einstein

Resultados

Identificación de nuevos efectores de Rap1b

Rap1b ha sido involucrada en una gran variedad de acciones biológicas, aunque la influencia de la fosforilación de Rap1b sobre su función es aún hoy poco clara. Un objetivo general de nuestro grupo de investigación es la identificación de proteínas cuya interacción con Rap1b sea modulada por la fosforilación. Dentro de este marco de trabajo, se llevaron a cabo ensayos de doble híbrido en levadura, utilizando la doble mutante de Rap1b, G12V-S179D (Rap1-D), en la conformación carnada, contra una biblioteca de péptidos proveniente de cerebro humano. Como control negativo se empleó una mutante no fosforilable, Rap1b-G12V-S179A (Rap1-A). En la tabla 1 figuran los clones identificados por esta técnica. Sobre la columna de la izquierda se encuentran los clones para la interacción con Rap1-D, es decir, los que exhibieron mayor crecimiento en medio de selección de la interacción y mayor coloración en ensayos de actividad β -galactosidasa en placa. En tanto, en la columna de la derecha figuran los clones que interactuaron con Rap1-A. La presencia de un mismo clone en ambas columnas sería indicativo de una interacción con ambas versiones de Rap y, por ende, independiente de la fosforilación.

Entre los clones que presentaron una interacción con Rap1-D en los ensayos de actividad β -galactosidasa en placa, atrajo especial atención la presencia de un péptido de 145 aminoácidos correspondiente al C-terminal de CAP1 (Proteína asociada a la adenilil ciclasa 1). Esta interacción nos resultó interesante ya que en *Saccharomyces cerevisiae* CAP había sido implicada en la activación de la adenilil ciclasa y la organización del citoesqueleto. Particularmente, se observó que en *Saccharomyces* el N-terminal de CAP1 interacciona con Ras y la adenilil ciclasa, estimulando un aumento en los niveles de AMPc, mientras que el C-terminal está involucrado en la organización del filamento de actina [126]. Sumado a esto, considerando que la inducción de la proliferación por AMPc [83] estaría mediada por la rápida fosforilación [33] y activación de Rap1b [84, 86], nos pareció de gran relevancia evaluar el rol de la interacción entre Rap1b y CAP1 sobre dicha acción.

Rap1b-G12V-S179D	Rap1b-G12V-S179A
ATPase	ATPase
WDR1	OTUD5
CAP1	Nucleora protein 4(NOLP)
Contactin2	profilin2
RalGDS	RalGDS
Cdc4	RGL
Fbox WD40	
FBXW7	
Ubiquitin activating enzyme E1	
Rab2	
RalGDA	
Cryptochrome	
Ras Rab interacter 2	
RasSF5 D	
RIN1	
PHD zinc finger transcription	
Transcriptional factor IGHM enhancer	
FLJ14201	
Bac clone PR11-556N4	

Tabla 1. Clones identificados en el Rastreo por Doble Híbrido en Levadura. Las construcciones de Rap1b-G12V-S179D o Rap1b-G12V-S179A en la conformación carnada, fueron utilizados contra una biblioteca de péptidos proveniente de cerebro humano. La tabla muestra los clones con actividad β -gal elevada para cada mutante de Rap.

Colocalización CAP1/Rap1b

La interacción entre Rap1b y CAP1 encontrada por doble híbrido, fue evaluada mediante inmunofluorescencia en células de tiroides de rata (PCCl3). Para ello, cultivos celulares fueron transfectadas con GFP-Rap1b y posteriormente analizados por microscopía, utilizando para el revelado de CAP endógeno un anticuerpo anti-CAP (figura 22).

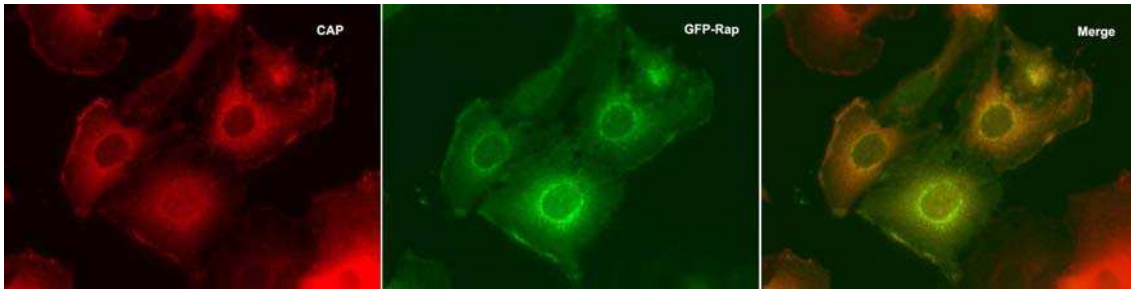


Figura 22. Co localización Rap1b/CAP1. Células PCCl3, expresando GFP-Rap fueron fijadas y analizadas para la colocalización de Rap1b y con CAP endogeno.

Caracterización de la interacción Rap1b/CAP1

Evaluación de la dependencia de la fosforilación y nucleótido

Intentando descifrar los detalles moleculares de la interacción entre Rap y CAP en células de mamífero, se realizaron ensayos de precipitación (Pull Down), empleando distintas mutantes de Rap1b fusionadas a Glutación S-Transferasa (GST-Rap1b). Como primera medida se emplearon Rap1b-G12V (Rap1), Rap1b-G12V-S179A (Rap1-A), Rap1b-G12V-S179D (Rap1-D), Rap1b salvaje (Wt) y la mutante dominante negativa Rap1-N17 (N17)[127]. Las distintas construcciones de GST-Rap1b fueron cotransfectadas junto a HA-CAP1 y sobre-expresadas por 48hs. En todos los casos se observó interacción entre Rap1b y CAP1 (figura 23). La cotransfección, sobre-expresión y pull down de las distintas mutantes de Rap1b fusionadas a GST, no arrojaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad de Rap1b de interactuar con CAP1, reflejado esto en la capacidad de todas las mutantes de Rap1b de arrastrar a CAP del lisado al precipitado.

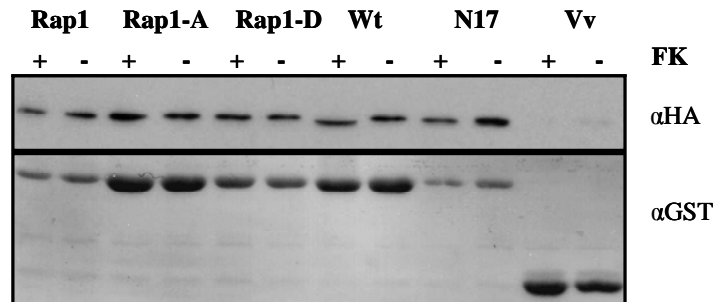


Figura 23. interacción entre Rap1b y CAP1. Rap1b salvaje (Wt) y las mutantes de Rap1b, G12V (Rap1), G12V-S179A (Rap1-A), G12V-S179D (Rap1-D) y N17 (N17), así como el vector vacío (Vv), como fusión a GST, fueron cotransfectadas en un células HEK 293T junto a HA-CAP1. La interacción fue medida mediante la precipitación de las GST-Raps a través una resina de glutatión-agarosa y las proteínas unidas a estas fueron identificadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra el epítipo HA y GST.

Interacción entre CAP1 y mutantes del dominio efector de Rap1b

En todos los casos conocidos, la unión de los efectores a Rap1b se da a través del dominio de unión a efectores (residuos 32 a 40). Por esta razón, se planteo evaluar si la interacción con CAP, un potencial efector de Rap1b, se producía también a través de esta región de reconocimiento de efectores. Para ello, se utilizaron mutantes de dicho dominio que permiten la interacción selectiva con RalGDS, Raf y PI 3-kinase p110 α (E37G, D38A/E y Y40C, respectivamente), mientras que al mismo tiempo son capaces de abolir la interacción con los otros dos efectores [128-130]. Como se observa en la figura 24, ninguna de las mutantes, en sus formas fosforilables o fosfomiméticas (S179D), lograron inhibir la interacción entre Rap1b y CAP1.

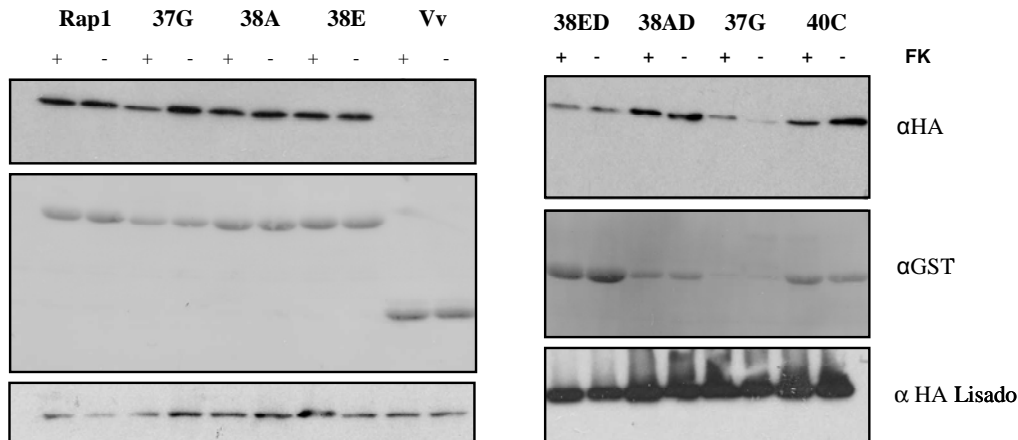


Figura 24. interacción entre mutantes de sitio de unión a efectores de Rap1b y CAP1. Las mutantes de Rap1b, G12V (Rap1), E37G (37G), D38A (38A), D38E (38E), D38A-S179D (38AD), D38E-S179D (38ED) y Y40C (40C), como fusión a GST, fueron cotransfectadas en células HEK 293T junto a HA-CAP1. La interacción fue medida mediante la precipitación de las GST-Raps a través una resina de glutatión-agarosa y las proteínas unidas a estas fueron identificadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra el epítipo HA y GST.

Los ensayos de pull down nos permitieron confirmar la existencia de una interacción física entre Rap1b y CAP1, interacción independiente del contenido nucleotídico y del estado fosforilación de Rap1b.

La existencia en *Saccharomyces cerevisiae* de una interacción RAS/CAP independiente del nucleótido [131], pero dependiente de la isoprenilación de RAS [132], nos llevó a razonar que esta interacción podría también estar involucrada en la interacción entre Rap1 y CAP. Aunque en *Saccharomyces*, la asociación de RAS se produce con el extremo N-terminal de CAP, mientras que en este caso la interacción entre Rap1 y CAP ocurre con el extremo C-terminal de CAP, nos propusimos evaluar la hipótesis de una interacción Rap/CAP dependiente de la isoprenilación.

Importancia de la isoprenilación en la interacción Rap/CAP

Como fuera mencionado en la introducción, Rap1b sufre una isoprenilación en la cisteína 181. Obtuvimos entonces una proteína de fusión entre GST y una mutante de sitio de isoprenilación (C181G) de Rap1b. Las construcciones se cotransfectaron, junto a HA-CAP1, en células HEK 293T y se evaluó la interacción a través de ensayos de Pull Down. Estos experimentos nos permitieron confirmar la hipótesis de una interacción Rap/CAP dependiente de la isoprenilación de Rap1b (figura 25).

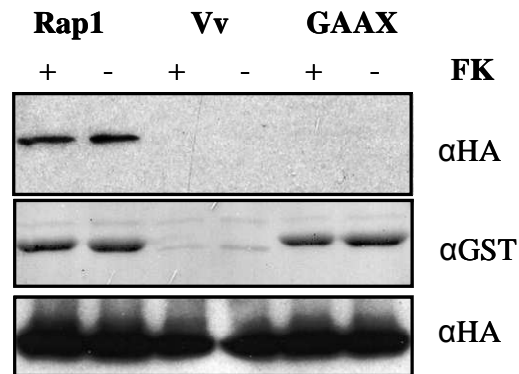


Figura 25. interacción entre de Rap1b y CAP1 dependiente de la isoprenilación. Las mutantes de Rap1b, G12V (Rap1) y G12V-C181G (GAAX) como fusión a GST, fueron cotransfectadas en un células HEK 293T junto a HA-CAP1. La interacción fue medida mediante la precipitación de las GST-Raps a través una resina de glutatión-agarosa y las proteínas unidas a estas fueron identificadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra el epitope HA y GST.

Sin embargo, la pérdida de la interacción entre Rap y CAP podría deberse a que la localización de la mutante de sitio de isoprenilación de Rap1, sea distinta que la proteína isoprenilada. Quisimos descartar hipótesis como razón para la falta de interacción una compartimentalización diferencial. Para ello, llevamos a cabo el ensayo de interacción combinando lisados provenientes de cultivos transfectados de manera independiente, ya sea con alguna de las variantes de GST-Rap1b o con HA-CAP1 (figura 26A). Con el

mismo fin, una segunda estrategia utilizada fue la cotransfección de GST-CAP1 y HA-Rap1b o HA-Rap1b-GAAX (figura 26B).

Tanto CAP y Rap1 provenientes de cultivos tranfectados de manera independiente, como proteínas expresadas en la conformación opuesta a los ensayos originales (GST-CAP y HA-Rap1), presentaron una interacción dependiente de la isoprenilación de Rap1b.

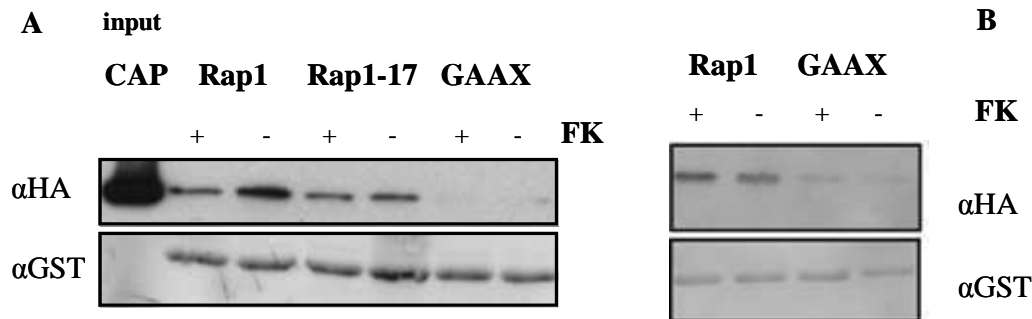


Figura 26. interacción entre de Rap1b y CAP1 dependiente de la isoprenilación. A) Las mutantes de Rap1b, G12V (Rap1), N17 (Rap1-17) y G12V-C181G (GAAX) como fusión a GST, por un lado, y HA-CAP1, por el otro; fueron transfectadas distintos cultivos de células HEK 293T. B) GST-CAP1 y las mutantes de Rap1 G12V (Rap1) y G12V-C181G (GAAX), fusionadas a una cola de histidinas fueron cotransfectadas en células HEK 293T. En ambos casos, la interacción fue medida mediante la precipitación de las GST a través una resina de glutatión-agarosa y las proteínas unidas a estas fueron identificadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra HA y GST.

Efectos de proteínas reguladoras de Rap1b sobre la interacción Rap1b/CAP

La interacción entre Rap1 y CAP demostró ser independiente del nucleótido y la fosforilación. Sin embargo, no podíamos descartar la posibilidad que en las condiciones de sobre-expresión que se llevaron a cabo los ensayos de pull down, interacción mediada por la isoprenilación de Rap, estuviera enmascarando los efectos del nucleótido o la fosforilación. Decidimos confirmar la independencia del nucleotido a través de una segunda estrategia, la cotransfección de la variante salvaje de Rap1b junto a proteínas reguladoras de su activación, Epac (GEF) y RapGap (GAP). Células HEK 293T fueron cotransfectadas con GST-Rap1b, HA-CAP1 y Epac o RapGAP. Los resultados en la figura

24 indican que en presencia de Epac los niveles de interacción entre Rap y CAP fueron comparables con los vistos en ausencia de proteínas reguladoras, lo que estria indicando una independencia del GTP, mientras que la cotransfección con RapGAP provocó un aumento en la interacción entre Rap y CAP. Inversamente, en presencia de RapGAP la fosforilación de Rap1 fue inhibida. Sumado a esto, el hecho que la sobre-expresión de RapGAP logra inducir la completa hidrólisis del GTP, de manera que Rap1 no logra ser detectada en ensayos de activación utilizando el el RBD de RalGDS (no mostrado), nos llevo a razonar que la proteína unida a GDP y sin fosforilar interactuaría mas fuertemente con CAP.

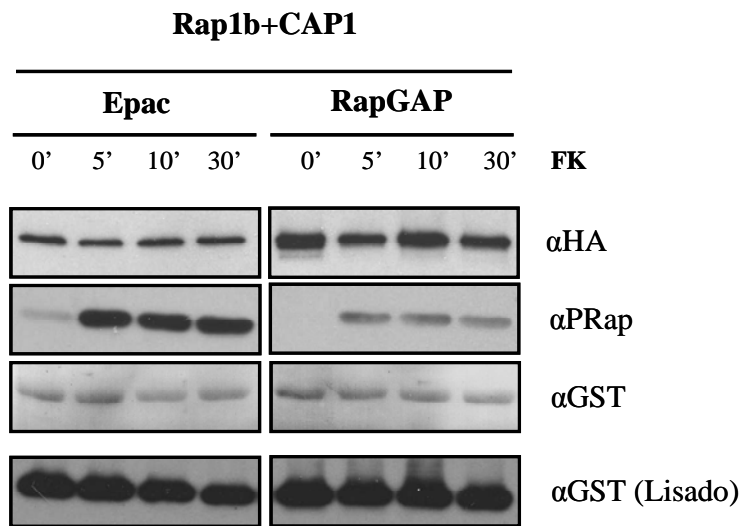


Figura 27. Interacción entre de Rap1b y CAP1 en presencia de proteínas reguladoras. GST-Rap1b (salvaje), HA-CAP1 y myc-Epac o HA-RapGAP (en relación 0.5:2:0.5 respectivamente) fueron cotransfectadas en células HEK 293T y a las 48hs la interacción fue medida mediante la precipitación de las GST a través una resina de glutatión-agarosa y las proteínas unidas a estas fueron identificadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra el epitope HA, P-Rap1b y GST.

Efectos de la fosforilación PKA dependiente sobre la interacción Rap1b/CAP

En modelos de Drosophila y Dictyostelium, ha sido demostrado que la función de CAP requiere de la actividad de PKA, aunque no se ha evaluado aún en ninguno de estos sistemas la hipótesis de una regulación dependiente de la fosforilación [133-136]. Sumado

a esto, la sobre-expresión de RapGAP dio como resultado un aumento en la interacción entre Rap1 y CAP, exhibiendo a la vez una disminución en la fosforilación de Rap1b. Con el objeto de evaluar la importancia de la actividad de PKA en la interacción, células HEK 293 fueron cotransfectadas con HA-CAP y Rap1b-N17, mutante dominante negativa de Rap1 que une preferentemente GDP (figura 28). Previo a la inducción con FK, los mismos fueron pretratados con H89, un inhibidor de la fosforilación mediada por PKA. La inhibición farmacológica de PKA logró reproducir lo visto en el caso de la cotransfección con RapGAP, observándose que la proteína no fosforilada y cargada con GDP queda retenida más fuertemente al complejo que forma con CAP.

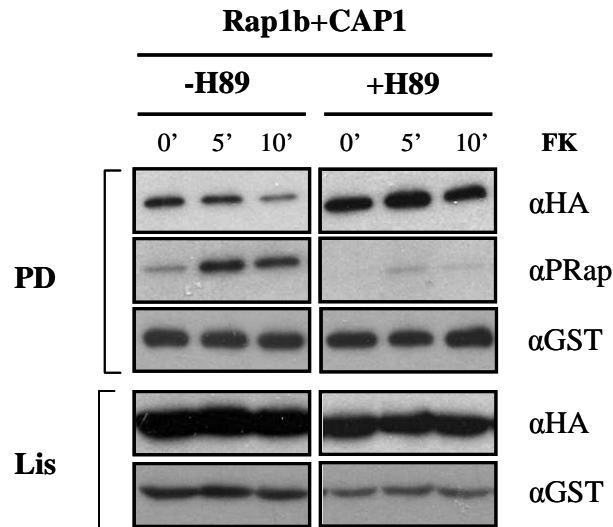


Figura 28. interacción entre de Rap1b y CAP1 en presencia de un inhibidor de la fosforilación dependiente de PKA. La mutante Rap1b-N17 en fusión a una GST y HA-CAP1 fueron cotransfectadas en células HEK 293T. 48hs los cultivos fueron tratados con H89 durante 30 minutos, y posteriormente inducidos con FK. La interacción fue medida mediante la precipitación de las GST a través una resina de glutatión-agarosa y las proteínas unidas a estas fueron identificadas por Western Blot utilizando anticuerpos monoclonales contra el epítipo HA, P-Rap1b y GST.

Acción biológica de la asociación Rap1b y CAP1

Caracterizada la interacción, el próximo paso fue evaluar la existencia de una acción biológica mediada por esta interacción y analizar el potencial rol de CAP1 en la proliferación celular en un modelo de células de tiroides de rata (PCC13), donde la acción mitogénica del AMPc es mediada por la activación dependiente de Epac y la fosforilación por PKA de Rap1b [86].

Supresión de la expresión de CAP1 por ARN interferente

Con el objetivo de abolir la expresión de CAP1 en el sistema utilizado, se diseñó un ARN interferente (ARNi), generando una secuencia de ARN en forma de horquilla y cuyo blanco fuera el transcrito de CAP1. La supresión de la expresión de CAP fue confirmada por Western Blot en células HEK 293T (figura 29A) e inmunofluorescencia en células PCC13 (figura 29B).

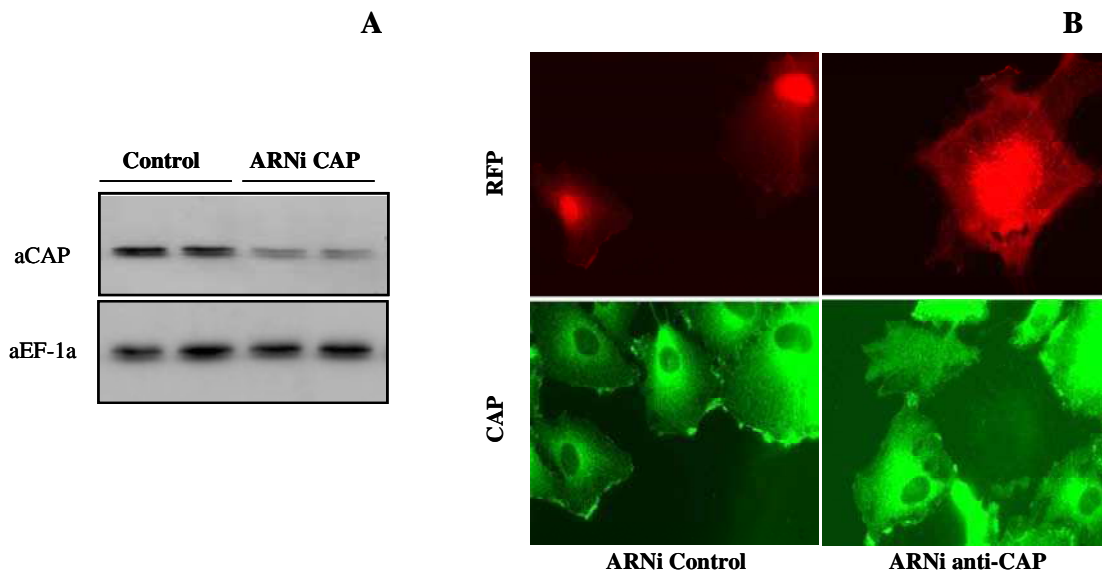


Figura 29. Supresión de la expresión de CAP. A) Células HEK 293 y B) células PCC13, fueron transfectadas con el vector pSIREN transportando el fragmento de CAP para producir un ARNi contra el mensajero de CAP. La supresión de la expresión endógena de CAP se midió por Western Blot empleando un anticuerpo anti CAP1 y por inmunofluorescencia, respectivamente.

Ratificada la eficacia del ARNi de silenciar la expresión de CAP1, células de tiroides de rata fueron cotransfectadas con Rap1b-G12V y el ARNi contra CAP1. Se cuantifico la proliferación celular, inducida por TSH, como medida de la incorporación de Bromodeoxyuridina (figura 30A). El tratamiento con TSH indujo un aumento del 25% en la incorporación de BrdU en células control, respecto del control sin tratar. Sin embargo, la transfección con ARNi anti-CAP1 produjo una reducción significativa en la incorporación de BrdU. La inhibición de la proliferación inducida por la supresión de la expresión de CAP1, pudo ser rescatada a través de la sobre-expresión de la mutante Rap, Rap1b-G12V-S179D. Estos resultados indicarían que CAP1 estaría actuando río arriba de Rap1b en la inducción de la mitogénesis mediada por TSH.

Para confirmar que el efecto inhibitorio de CAP1 era exclusivamente causado por la supresión de la expresión de la misma, se diseñó una mutante de CAP1 (C1080A) resistente al ARNi (CAP Res). La resistencia fue comprobada por western Blot (30B). Como se observa en la figura 30C, esta mutante logró rescatar los efectos inhibitorios del ARNi anti-CAP1 sobre la mitogénesis.

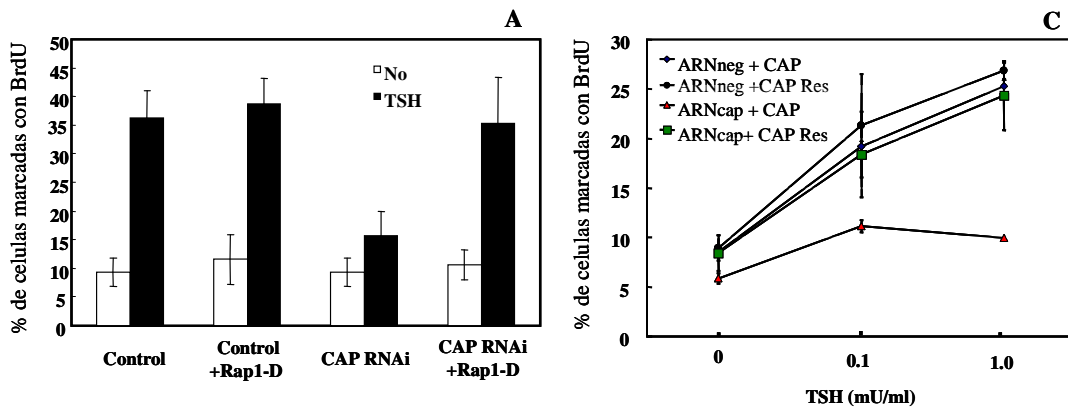


Figura 30. Inhibición de la mitogénesis dependiente de TSH por supresión de la expresión de CAP1. A) Células PCC13 cotransfectadas con las construcciones correspondientes, fueron marcadas con BrdU y visualizadas por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti BrdU. B) Células PCC13, fueron transfectadas con el vector pSIREN transportando el fragmento de CAP para producir un ARNi contra el mensajero de CAP. La expresión endógena de CAP se midió por Western Blot empleando un anticuerpo anti CAP. C) Células PCC13 cotransfectadas con HA-CAP, una mutante de CAP resistente a ARNi (CAP Res), la construcción interferente (ARNcap) y un ARN control (ARNneg) marcadas con BrdU y visualizadas por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti BrdU.

Efectos de CAP1 sobre la activación y fosforilación de Rap1b

Considerando que CAP1 estaría actuando río arriba de Rap1b, decidimos analizar el efecto del ARNi anti-CAP sobre la activación y fosforilación de Rap1b. Se observó en células PCC13, donde la producción de CAP1 está suprimida por la presencia del ARNi anti CAP, una inhibición de la activación de Rap1b (31A). De manera similar, la fosforilación de Rap1b fue negativamente afectada por la ausencia de CAP1 (31B). De acuerdo con estos resultados, CAP1 sería necesaria para la activación y fosforilación de Rap1b mediada por AMPc.

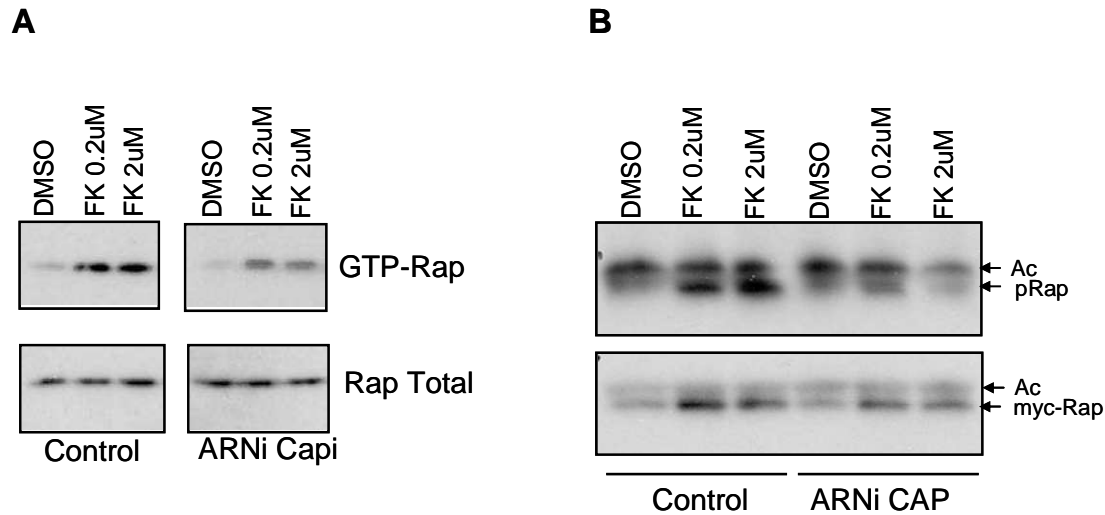


Figura 31. inhibición de la activación y fosforilación de Rap1b por supresión de la expresión de CAP1. **A)** Ensayos de activación de Rap1 fueron realizados a partir de GST-RalGDS purificado de *E.coli* y lisados de células PCC13 cotransfectadas con HA-Rap1b y ARNi contra CAP1, y tratadas con FK. **B)** células PCC13 transfectadas con myc-Rap y tratadas con FK fueron lisadas y sujetas a inmuno precipitación utilizando un anticuerpo anti Myc. La presencia de Rap fosforilada en el precipitado fue medida por Western Blot utilizando un anticuerpo anti Rap fosforilada. La membrana fue posteriormente despojada del primer anticuerpo y reanalizada utilizando un anticuerpo anti myc para detectar Rap total.

Efecto de CAP sobre la producción de cAMP

En *Saccharomyces*, CAP1 estimula a la adenilil ciclasa y induciendo un aumento de los niveles de AMPc [137, 138]. Para comprobar si este mecanismo se encontraba involucrado en la inducción de la activación y fosforilación de Rap1b, medimos los niveles de AMPc en presencia de ARNi anti-CAP. Logramos verificar que la pérdida de la expresión de CAP1 produce una disminución en los niveles de AMPc (figura 32).

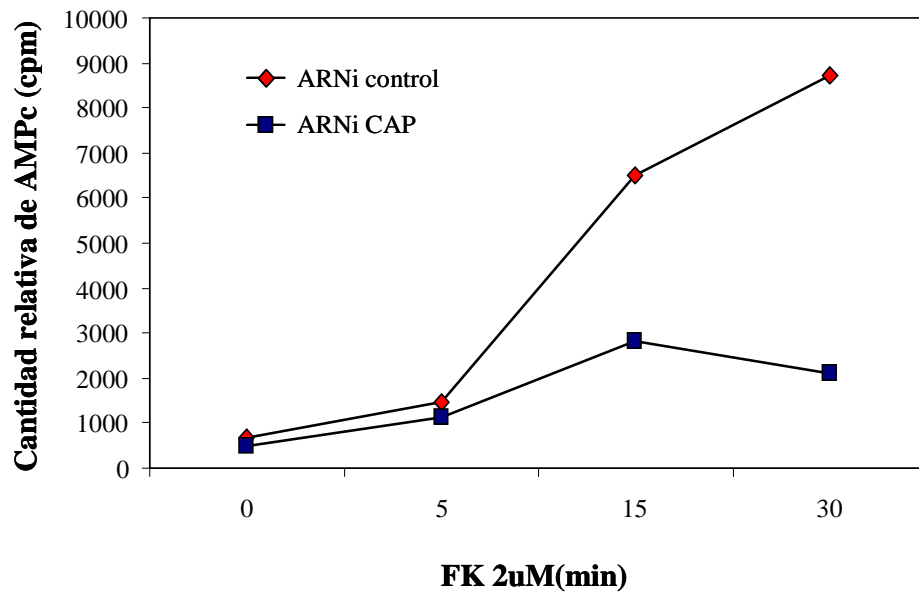


Figura 32. Cuantificación de los niveles de AMPc en presencia de ARNi anti-CAP. Se midieron los niveles intracelulares de AMPc en células PCC13 transfectadas con ARNi contra CAP (ARNi CAP) o ARN inespecífico (ARNi control), a distintos tiempos en presencia de FK.

Discusión

En un intento de identificar proteínas que interactúen con Rap1b de manera fosfo-dependiente, se realizaron ensayos de doble híbrido en levadura. Estos ensayos nos permitieron identificar efectores ya conocidos, así como nuevas proteínas interactuantes. Entre las proteínas identificadas que nos llamo especial atención las relacionadas con la organización del citoesqueleto, como CAP1 y PFN2, proteínas que han sido propuestas como una conexión entre el crecimiento celular y la reorganización del citoesqueleto [139].

En *Saccharomyces cerevisiae*, RAS es capaz de interactuar y estimular la actividad de la adenilil ciclasa (CYR1) [137, 138]. Intentando descifrar el mecanismo a través del cual RAS lleva a cabo esta acción, se identificó una proteína de ~70kDa asociada a la adenilil ciclasa (CAP) [140]. CAP fue originalmente descrita como una proteína bifuncional, donde cada función se encuentra asociada con un dominio distinto dentro de la misma [141]. El extremo N-terminal de CAP es necesario y suficiente para la estimulación de por RAS [141], e interactúa con la CYR1 generando un segundo sitio de unión de RAS al complejo CAP-CYR1 [131]. La interacción RAS-CAP resultó ser independiente del nucleótido [131], pero dependiente de la isoprenilación de RAS [132]. Al mismo tiempo, el extremo C-terminal esta involucrado en el mantenimiento de la morfología normal y la respuesta a stress nutricional, a través de su capacidad de unir actina [139, 141, 142]. CAP presenta otros dominios funcionales conservados. Estos dominios corresponden a una región rica en prolina localizada en la parte central de la proteína, con capacidad de unir proteínas que presenten dominios SH3 [143], así como de interactuar con profilina [144]; un dominio homólogo a verprolina, generalmente presente en la familia de proteínas WASP, las cuales poseen la capacidad de unir monómeros de actina [145]; y un dominio de oligomerización, que no ha sido aún definido, pero que sería importante para la formación y localización de multímetros [126].

CAP se encuentra evolutivamente conservada en muchos organismos eucariotas, incluyendo *Drosophila*, *Xenopus*, plantas y mamíferos, aunque no en todos los casos la interacción física o regulación de la adenilil ciclasa ha sido probada [126]. Si bien la activación de la adenilil ciclasa dependiente de RAS no ha sido evidenciada para la variante humana de CAP, sí ha sido demostrado que CAP interactúa con actina [146],

regula el ensamblado del filamento de actina [147] y es un importante factor en el reciclado de cofilina y actina [148].

En un rastreo para aislar genes involucrados en polaridad en oocitos de *Drosophila*, se identificó una mutante de CAP que presentara una organización de actina alterada [133]. Este rastreo permitió además encontrar similitudes fenotípicas entre la mutante de CAP y una mutante de la subunidad catalítica de PKA, sugiriendo que CAP y PKA actúan juntas en la organización del citoesqueleto y la polaridad del oocito de *Drosophila*. Dentro de este marco, CAP podría ser un componente de la vía de señalización AMPc-PKA, al facilitar la activación de la adenilil ciclasa río arriba de PKA, o podría encontrarse río abajo de PKA y ser sustrato de regulación por PKA [133]. En este sentido, en un trabajo paralelo se determinó que el gen homólogo a *cap*, *act up* (*acu*), estaba involucrado en el desarrollo del ojo en *Drosophila* y que en mutantes de dicho gen el fenotipo podía ser recuperado con la expresión del C-terminal de CAP [134]. Esto indicaría que la interacción del N-terminal de CAP y la adenilil ciclasa no sería esencial en el caso de células somáticas de *Drosophila*, pero abriría la posibilidad de que la fosforilación dependiente de PKA sea un regulador de CAP. Asimismo, en *Dictyostelium* se observó que una mutante de CAP, donde la expresión de endógena se encontraba fuertemente reducida, presentaba una morfología y un crecimiento celular anormales [135]. En este sistema se vio que la localización y funcionamiento de CAP requería de PKA, un regulador esencial en todas las etapas del desarrollo de *Dictyostelium* [136]. Tanto en *Drosophila* como *Dictyostelium*, ha sido demostrado que la función de CAP requiere de la actividad de PKA, aunque no se ha evaluado aún en ninguno de estos sistemas la hipótesis de una regulación dependiente de la fosforilación. La existencia en la secuencia de CAP de potenciales sitios de fosforilación por PKA [149-151] abre la posibilidad de que CAP sea sustrato de fosforilación de PKA, aunque no puede descartarse que la regulación fosfo-dependiente sea ejercida sobre CAP de manera indirecta. En este trabajo, el descubrimiento de CAP como par interactuante de Rap1b, sustrato también de PKA e involucrada en un amplio rango de funciones celulares como proliferación, adhesión, polarización y morfogénesis, abre aún más el abanico de posibilidades de regulación de CAP por PKA.

Ensayos de colocalización y de pull down en células de mamífero nos permitieron demostrar la existencia de una interacción física entre Rap1b y CAP1, que resultara ser estrictamente dependiente de la isoprenilación de Rap1, pero en principio independiente del nucleótido y la fosforilación de Rap.

Interacciones dependientes de la isoprenilación de una GTPasa han sido descritas para Rho/RhoGDI [152, 153] y Galectina/Ras [154-156]. Aunque estas interacciones estén involucradas en funciones biológicas diferentes, RhoGDI está implicado en la regulación de la activación de Rho [8] y las galectinas regulan la formación de nanoclusters de Ras en membrana [157, 158], la asociación del geranilgeranil de Rho y el farnesil de Ras, con los respectivos bolsillos hidrofóbicos presentes en RhoGDI y en galectina1, se encuentra estructuralmente conservada [155]. Surge así la posibilidad que un potencial bolsillo hidrofóbico presente en el extremo C-terminal de CAP1 acomode el grupo geranilgeranil de Rap1b. En la figura 33 comparamos las estructuras conocidas del bolsillo hidrofóbico de la galectina1 y el potencial bolsillo formado por el extremo C-terminal de CAP1.

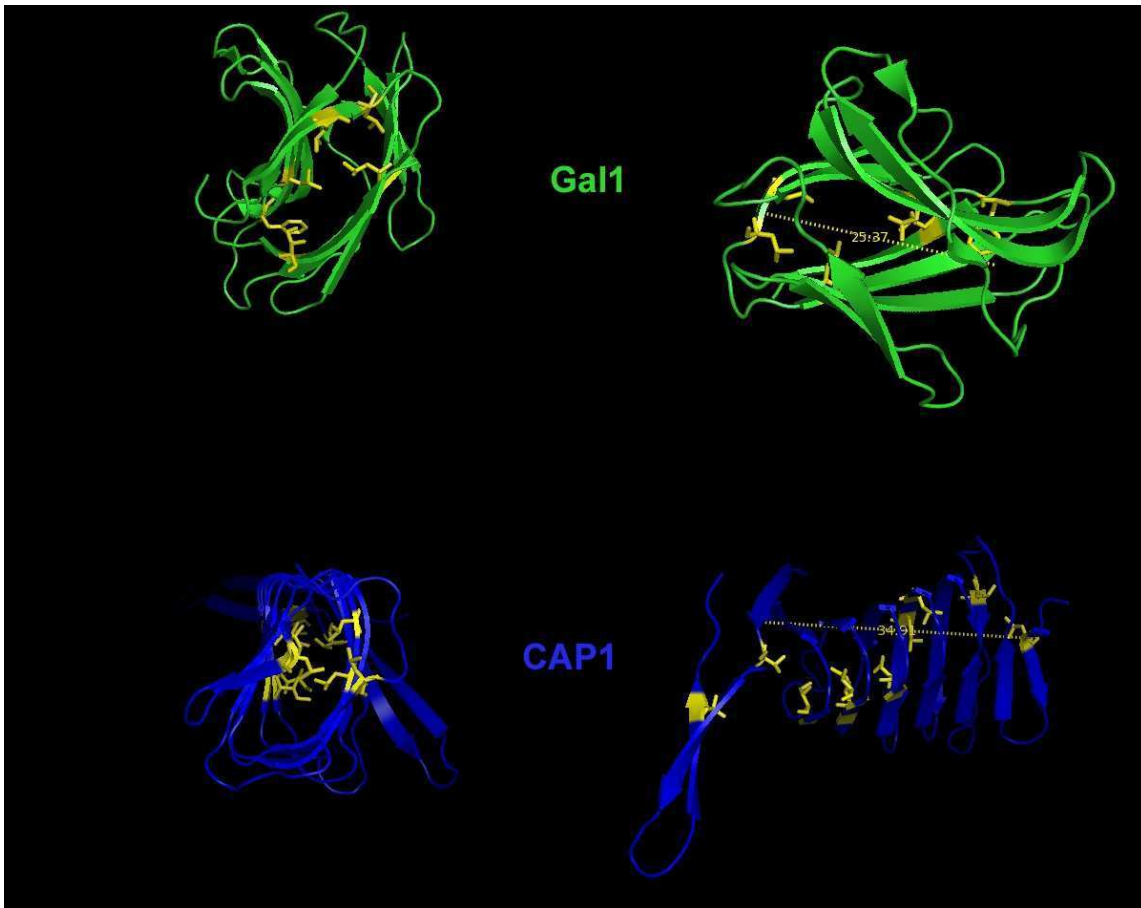


Figura 33. Estructura de los bolsillos hidrófobos presentes en Galectina1 y CAP1. Las estructuras de los bolsillos hidrofóbicos de Gal1 (verde) y CAP1 (azul), fueron comparados utilizando PyMol. En amarillo figuran los residuos de cadenas hidrofobicas que serían importantes para acomodar al isoprenil.

El empleo de ARNi para silenciar la expresión de CAP1, nos permitió demostrar que CAP era necesaria en la respuesta mitogénica dependiente de TSH. La inhibición de la proliferación inducida por la supresión de la síntesis de CAP1, pudo ser rescatada a través de la sobre-expresión de la mutante constitutivamente activa de Rap1b, comprobándose que CAP1 se encuentra río arriba de Rap1b. Se probó también que la presencia de CAP era necesaria para la activación y fosforilación de Rap1b, y que estos efectos estarían mediados por la estimulación de la producción de AMPc dependiente de CAP.

En conjunto, los datos obtenidos indicarían que CAP estaría cumpliendo funciones de proteína andamio de Rap1b. El complejo se formaría a través de la interacción del extremo C-terminal de CAP1 y el geranylgeranil de Rap. La fosforilación de Rap1b por

PKA, y potencialmente de CAP, provocaría la liberación de Rap1b del complejo, liberación que, como en el caso de la fosforilación de K-Ras, tendría un efecto negativo en la formación de clusters pero positivo en la señalización [119]

En condiciones de sobre-expresión, RapGAP estaría impidiendo la liberación de Rap1, al inhibir la fosforilación mediada por PKA. Resultados no mostrados, indican que RapGAP interaccionaría con el par Rap1/CAP1, a través de la interacción con Rap1, con lo cual podría estar evitando el acceso de PKA al complejo y así la fosforilación de Rap1b. En condiciones fisiológicas, sería posible que la activación de PKA lleve a la fosforilación e inhibición la actividad de RapGAP, como fuera recientemente propuesto en neuronas [159] y de esta manera PKA ganaría acceso a Rap1b. La inhibición farmacológica de PKA tuvo efectos similares a los sobre-expresión de RapGAP, lo que podría estar indicando por otra parte, que la sobre-expresión de un potencial sustrato de PKA como lo sería RapGAP, estaría secuestrando a la quinasa e impidiendo así que su unión al complejo y la fosforilación de Rap1b.

Es sabido, que la señalización mediada por nucleótidos se encuentra compartimentalizada a través de la asociación de las quinasas y sus sustratos, a proteínas andamio [160, 161]. En el caso del AMPc, la especificidad en la señalización mediada por PKA esta en parte dada por la interacción de la subunidad regulatoria de la quinasa con proteínas de anclaje de la quinasa A (AKAPs). Las AKAPs poseen la capacidad de coordinar una respuesta, al agrupar a varios de los miembros de una misma cascada de señalización [162]. Es cada día mas claro, también, que la estimulación de la mitogénesis mediada por AMPc requiere tanto de eventos PKA dependientes como independientes. Se ha demostrado en cultivos celulares [82] y en un modelo murino [87] que Rap1b, sustrato de Epac y PKA, tiene un rol esencial en la proliferación celular mediada por AMPc, actuando como integrador de la respuesta PKA dependiente e independiente [86]. En este caso, la compartimentalización subcelular de Epac resultó esencial en la activación de Rap1b, indicando que Epac, Rap y PKA formarían parte de un complejo crítico para la acción del AMPc en la proliferación celular [86]. Observaciones no publicadas, indican que en este complejo Epac interactuaría directamente con un AKAP y estaría a la vez asociada a cPKA (Hochbaum D., et al). Sumado a esto, hemos observado la capacidad de Epac de interactuar con CAP1 (no mostrado), lo cual estaría agrupando en una misma

localización subcelular al complejo formado por AKAP-PKA-Epac con el complejo descrito en esta tesis Epac-CAP1-Rap1b (figura 34)

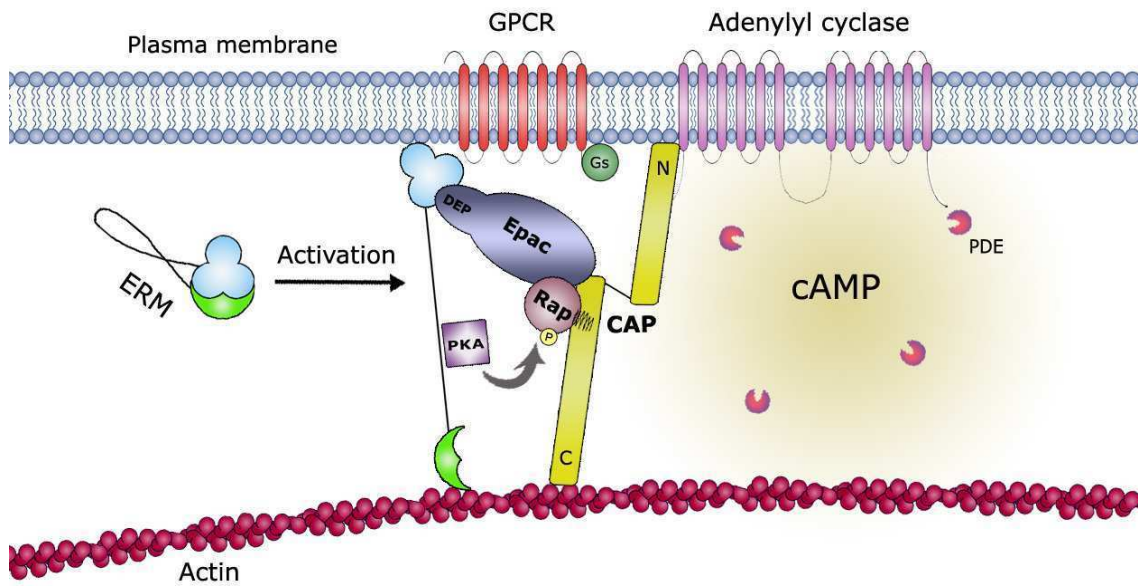


Figura 34. Modelo de trabajo. Nuevo compartimiento involucrado en la proliferación mediada por TSH en células de tiroides. Radixin, un AKAP, haciendo de conexión entre el citoesqueleto y la membrana plasmática es capaz de reclutar a los efectores de la respuesta dependiente de AMPc, PKA y Epac. Al mismo tiempo Epac tendría la capacidad de interactuar con CAP1, que sería el nexa entre Epac y PKA. La estimulación llevaría a la activación y fosforilación de Rap1, lo que llevaría a la liberación de la misma del complejo.

Conclusiones

“I haven't failed, I've just found 10,000 ways that don't work.” ~ Thomas A. Edison

- A través de una novedosa técnica de cotransformación en bacteria de la quinasa y su sustrato, se logró llevar a cabo un protocolo de purificación de alto rendimiento de Rap1-P, que nos permitiera realizar ensayos donde son requeridas altas concentraciones de proteínas, como lo son el DXMS y la cristalografía.
- Se puso en evidencia la existencia de un efecto alostérico de la fosforilación sobre los switch I y II, sugiriendo que la fosforilación podría tener efectos sobre la interacción con efectores, fijando un estado conformacional, o actuando como un discriminador alostérico de los estados conformacionales.
- La existencia de otros dominios que en presencia de la fosforilación presentan una exposición diferencial al solvente, pueden ser reflejo de los cambios conformacionales exhibidos en la molécula como consecuencia de la comunicación entre el C-terminal y el dominio efector, aunque no puede descartarse que sean nuevos dominios de reconocimiento de efectores, bajo la modulación fosforilación en S179.
- CAP1 demostró ser una proteína con funciones de andamio, involucrada en la microlocalización de Rap1b. Esta asociación resultó ser dependiente del isoprenil de Rap1b y regulada por la fosforilación en S179, comprobándose que CAP1 fue indispensable para la mediación por Rap1 de la respuesta a TSH. Asimismo, CAP1 estaría involucrada en la estimulación de la producción de AMPc, efecto no demostrado hasta el momento en células de mamífero.



Licenciado Martín M. Edreira



Dr. Daniel L. Altschuler

Referencias

“Siempre imaginé que el Paraíso sería algún tipo de biblioteca.” ~ Jose Luis Borges

1. Colicelli, J., *Human RAS Superfamily Proteins and Related GTPases*. Sci. STKE, 2004. **2004**(250): p. re13-.
2. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(5): p. 843-846.
3. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions*. Nature, 1990. **348**(6297): p. 125-132.
4. Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer, *GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins*. Cell, 2007. **129**(5): p. 865-77.
5. Downward, J., *Measurement of nucleotide exchange and hydrolysis activities in immunoprecipitates*. Methods Enzymol, 1995. **255**: p. 110-7.
6. Feig, L.A., *Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(2): p. 204-11.
7. Scheffzek, K. and M.R. Ahmadian, *GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(24): p. 3014-38.
8. DerMardirossian, C. and G.M. Bokoch, *GDI: central regulatory molecules in Rho GTPase activation*. Trends in Cell Biology, 2005. **15**(7): p. 356-363.
9. Seabra, M.C. and C. Wasmeier, *Controlling the location and activation of Rab GTPases*. Current Opinion in Cell Biology, 2004. **16**(4): p. 451-457.
10. Vetter, I.R. and A. Wittinghofer, *The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1299-304.
11. Bourne, H.R., D.A. Sanders, and F. McCormick, *The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 117-127.
12. Jaumot, M., et al., *The Linker Domain of the Ha-Ras Hypervariable Region Regulates Interactions with Exchange Factors, Raf-1 and Phosphoinositide 3-Kinase*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(1): p. 272-278.
13. Williams, C.L., *The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences*. Cellular Signalling, 2003. **15**(12): p. 1071-1080.
14. Hancock, J.F., *Ras proteins: different signals from different locations*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(5): p. 373-385.
15. Henis, Y.I., J.F. Hancock, and I.A. Prior, *Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review)*. Mol Membr Biol, 2009. **26**(1): p. 80-92.
16. Lane, K.T. and L.S. Beese, *Thematic review series: Lipid Posttranslational Modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I*. J. Lipid Res., 2006. **47**(4): p. 681-699.
17. Konstantinopoulos, P.A., M.V. Karamouzis, and A.G. Papavassiliou, *Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(7): p. 541-555.
18. Nassar, N., et al., *The 2.2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue*. Nature, 1995. **375**(6532): p. 554-60.
19. Ohmori, T., et al., *Small molecular weight GTP-binding proteins in human platelet membranes. Purification and characterization of a novel GTP-binding protein with a molecular weight of 22,000*. J Biol Chem, 1989. **264**(3): p. 1877-81.

20. Kitayama, H., et al., *A ras-related gene with transformation suppressor activity*. Cell, 1989. **56**(1): p. 77-84.
21. Valencia, A., et al., *The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids*. Biochemistry, 1991. **30**(19): p. 4637-48.
22. Zhang, K., et al., *Identification of small clusters of divergent amino acids that mediate the opposing effects of ras and Krev-1*. Science, 1990. **249**(4965): p. 162-5.
23. Frech, M., et al., *Inhibition of GTPase activating protein stimulation of Ras-p21 GTPase by the Krev-1 gene product*. Science, 1990. **249**(4965): p. 169-71.
24. Hata, Y., et al., *Inhibition of the ras p21 GTPase-activating protein-stimulated GTPase activity of c-Ha-ras p21 by smg p21 having the same putative effector domain as ras p21s*. J Biol Chem, 1990. **265**(13): p. 7104-7.
25. Ikeda, M., et al., *rap1 p21 regulates the interaction of ras p21 with RGL, a new effector protein of ras p21*. FEBS Lett, 1995. **375**(1-2): p. 37-40.
26. Feig, L.A., T. Urano, and S. Cantor, *Evidence for a Ras/Ral signaling cascade*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(11): p. 438-41.
27. Bos, J.L., J. de Rooij, and K.A. Reedquist, *Rap1 signalling: adhering to new models*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(5): p. 369-77.
28. Zwartkruis, F.J. and J.L. Bos, *Ras and Rap1: two highly related small GTPases with distinct function*. Exp Cell Res, 1999. **253**(1): p. 157-65.
29. Zwartkruis, F.J., et al., *Extracellular signal-regulated activation of Rap1 fails to interfere in Ras effector signalling*. EMBO J, 1998. **17**(20): p. 5905-12.
30. Franke, B., J.W. Akkerman, and J.L. Bos, *Rapid Ca²⁺-mediated activation of Rap1 in human platelets*. EMBO J, 1997. **16**(2): p. 252-9.
31. McLeod, S.J., et al., *Activation of the Rap1 GTPase by the B Cell Antigen Receptor*. J. Biol. Chem., 1998. **273**(44): p. 29218-29223.
32. Siess, W., D.A. Winegar, and E.G. Lapetina, *Rap1-B is phosphorylated by protein kinase A in intact human platelets*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **170**(2): p. 944-50.
33. Altschuler, D., Lapetina, E. G., *Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b*. J Biol Chem, 1993. **268**(10): p. 7527-31.
34. Stork, P.J.S., *Does Rap1 deserve a bad Rap?* Trends in Biochemical Sciences, 2003. **28**(5): p. 267-275.
35. Gotoh, T., et al., *Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G*. Mol. Cell. Biol., 1995. **15**(12): p. 6746-6753.
36. de Rooij, J., et al., *Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP*. Nature, 1998. **396**(6710): p. 474-7.
37. Kawasaki, H., et al., *A Family of cAMP-Binding Proteins That Directly Activate Rap1*. Science, 1998. **282**(5397): p. 2275-2279.
38. de Rooij, J., et al., *PDZ-GEF1, a Guanine Nucleotide Exchange Factor Specific for Rap1 and Rap2*. J. Biol. Chem., 1999. **274**(53): p. 38125-38130.
39. Kawasaki, H., et al., *A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(22): p. 13278-13283.

40. Clyde-Smith, J., et al., *Characterization of RasGRP2, a Plasma Membrane-targeted, Dual Specificity Ras/Rap Exchange Factor*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(41): p. 32260-32267.
41. Yamashita, S., et al., *CalDAG-GEFIII Activation of Ras, R-Ras, and Rap1*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(33): p. 25488-25493.
42. Ichiba, T., et al., *Characterization of GFR, a novel guanine nucleotide exchange factor for Rap1*. FEBS Lett, 1999. **457**(1): p. 85-9.
43. Jin, T.-G., et al., *Role of the CDC25 Homology Domain of Phospholipase Cepsilon in Amplification of Rap1-dependent Signaling*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(32): p. 30301-30307.
44. Yajnik, V., et al., *DOCK4, a GTPase Activator, Is Disrupted during Tumorigenesis*. Cell, 2003. **112**(5): p. 673-684.
45. Polakis, P.G., et al., *Purification of a plasma membrane-associated GTPase-activating protein specific for rap1/Krev-1 from HL60 cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(1): p. 239-243.
46. Nice, E.C., et al., *The purification of a Rap1 GTPase-activating protein from bovine brain cytosol*. J. Biol. Chem., 1992. **267**(3): p. 1546-1553.
47. Rubinfeld, B., et al., *Molecular cloning of a GTPase activating protein specific for the Krev-1 protein p21rap1*. Cell, 1991. **65**(6): p. 1033-42.
48. Mochizuki, N., et al., *Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G[alpha]i*. Nature, 1999. **400**(6747): p. 891-894.
49. Schultess, J., O. Danielewski, and A.P. Smolenski, *Rap1GAP2 is a new GTPase-activating protein of Rap1 expressed in human platelets*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3185-92.
50. Wienecke, R., A. König, and J.E. DeClue, *Identification of Tuberin, the Tuberous Sclerosis-2 Product*. J. Biol. Chem., 1995. **270**(27): p. 16409-16414.
51. Kurachi, H., et al., *Human SPA-1 Gene Product Selectively Expressed in Lymphoid Tissues Is a Specific GTPase-activating Protein for Rap1 and Rap2. SEGREGATE EXPRESSION PROFILES FROM A rap1GAP GENE PRODUCT*. J. Biol. Chem., 1997. **272**(44): p. 28081-28088.
52. Roy, B.C., et al., *Localization of a novel GAP family protein SPAL in the rat esophagus and heart*. Med Electron Microsc, 1999. **32**(1): p. 20-24.
53. Roy, B.C., et al., *SPAL, a Rap-specific GTPase activating protein, is present in the NMDA receptor-PSD-95 complex in the hippocampus*. Genes Cells, 2002. **7**(6): p. 607-17.
54. Gao, Q., et al., *The E6 Oncoproteins of High-Risk Papillomaviruses Bind to a Novel Putative GAP Protein, E6TP1, and Target It for Degradation*. Mol. Cell. Biol., 1999. **19**(1): p. 733-744.
55. Pak, D.T., et al., *Regulation of dendritic spine morphology by SPAR, a PSD-95-associated RapGAP*. Neuron, 2001. **31**(2): p. 289-303.
56. Spilker, C., et al., *SPAR2, a novel SPAR-related protein with GAP activity for Rap1 and Rap2*. J Neurochem, 2008. **104**(1): p. 187-201.
57. Bos, J.L., *All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral*. EMBO J, 1998. **17**(23): p. 6776-82.

58. Vossler, M.R., et al., *cAMP Activates MAP Kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-Dependent Pathway*. Cell, 1997. **89**(1): p. 73-82.
59. Ohtsuka, T., et al., *Activation of Brain B-Raf Protein Kinase by Rap1B Small GTP-binding Protein*. J. Biol. Chem., 1996. **271**(3): p. 1258-1261.
60. Rodriguez-Viciana, P., C. Sabatier, and F. McCormick, *Signaling Specificity by Ras Family GTPases Is Determined by the Full Spectrum of Effectors They Regulate*. Mol. Cell. Biol., 2004. **24**(11): p. 4943-4954.
61. Peterson, S.N., et al., *Identification of a novel RalGDS-related protein as a candidate effector for Ras and Rap1*. J Biol Chem, 1996. **271**(47): p. 29903-8.
62. Wolthuis, R.M., et al., *RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap 1A-associating protein*. Oncogene, 1996. **13**(2): p. 353-62.
63. Raaijmakers, J.H. and J.L. Bos, *Specificity in ras and rap signaling*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 10995-9.
64. Pannekoek, W.-J., et al., *Cell-cell junction formation: The role of Rap1 and Rap1 guanine nucleotide exchange factors*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2009. **1788**(4): p. 790-796.
65. Medeiros, R.B., et al., *Protein Kinase D1 and the [beta]1 Integrin Cytoplasmic Domain Control [beta]1 Integrin Function via Regulation of Rap1 Activation*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 213-226.
66. Jeong, H.-W., et al., *IQGAP1 Binds Rap1 and Modulates Its Activity*. J. Biol. Chem., 2007. **282**(28): p. 20752-20762.
67. Rall, T.W. and E.W. Sutherland, *FORMATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE BY TISSUE PARTICLES*. J. Biol. Chem., 1958. **232**(2): p. 1065-1076.
68. Sutherland, E.W. and T.W. Rall, *FRACTIONATION AND CHARACTERIZATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE FORMED BY TISSUE PARTICLES*. J. Biol. Chem., 1958. **232**(2): p. 1077-1092.
69. Sutherland, E.W., *Studies on the mechanism of hormone action*. Science, 1972. **177**(47): p. 401-8.
70. Tasken, K. and E.M. Aandahl, *Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A*. Physiol. Rev., 2004. **84**(1): p. 137-167.
71. Dremier, S., et al., *The Role of Cyclic AMP and Its Effect on Protein Kinase A in the Mitogenic Action of Thyrotropin on the Thyroid Cell*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2002. **968**(PROTEIN KINASE A AND HUMAN DISEASE): p. 106-121.
72. Pastan, I.H., G.S. Johnson, and W.B. Anderson, *Role of Cyclic Nucleotides in Growth Control*. Annual Review of Biochemistry, 1975. **44**(1): p. 491-522.
73. Stork, P.J. and J.M. Schmitt, *Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation*. Trends Cell Biol, 2002. **12**(6): p. 258-66.
74. Roger, P.P., et al., *Multiple facets of the modulation of growth by cAMP*. Vitam Horm, 1995. **51**: p. 59-191.
75. Richards, J.S., *New Signaling Pathways for Hormones and Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Action in Endocrine Cells*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(2): p. 209-218.
76. Dumont, J.E., et al., *Growth and proliferation of the thyroid cell in normal physiology and in disease*. Ann Endocrinol (Paris), 2003. **64**(1): p. 10-1.

77. Walsh, D.A., J.P. Perkins, and E.G. Krebs, *An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle*. J. Biol. Chem., 1968. **243**(13): p. 3763-3765.
78. Kaupp, U.B. and R. Seifert, *Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels*. Physiol. Rev., 2002. **82**(3): p. 769-824.
79. Brock, M., et al., *Conformational analysis of Epac activation using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*. J Biol Chem, 2007. **282**(44): p. 32256-63.
80. Cook, S.J., et al., *RapVI2 antagonizes Ras-dependent activation of ERK1 and ERK2 by LPA and EGF in Rat-1 fibroblasts*. EMBO J, 1993. **12**(9): p. 3475-85.
81. Schmitt, J.M. and P.J. Stork, *Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(11): p. 3671-83.
82. Ribeiro-Neto, F., et al., *On the mitogenic properties of Rap1b: cAMP-induced G(1)/S entry requires activated and phosphorylated Rap1b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5418-23.
83. Altschuler, D.L. and F. Ribeiro-Neto, *Mitogenic and oncogenic properties of the small G protein Rap1b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7475-9.
84. Altschuler, D.L., et al., *Cyclic AMP-dependent activation of Rap1b*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10373-6.
85. Rozengurt, E., et al., *Cyclic AMP: a mitogenic signal for Swiss 3T3 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(7): p. 4392-6.
86. Hochbaum, D., et al., *Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis*. J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 4464-8.
87. Ribeiro-Neto, F., et al., *cAMP-dependent oncogenic action of Rap1b in the thyroid gland*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46868-75.
88. Kawata, M., et al., *Phosphorylation of smg p21, a ras p21-like GTP-binding protein, by cyclic AMP-dependent protein kinase in a cell-free system and in response to prostaglandin E1 in intact human platelets*. J Biol Chem, 1989. **264**(26): p. 15688-95.
89. Lapetina, E.G., et al., *A ras-related protein is phosphorylated and translocated by agonists that increase cAMP levels in human platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(9): p. 3131-4.
90. Hata, Y., et al., *Enhancement of the actions of smg p21 GDP/GTP exchange protein by the protein kinase A-catalyzed phosphorylation of smg p21*. J Biol Chem, 1991. **266**(10): p. 6571-7.
91. Bokoch, G.M. and L.A. Quilliam, *Guanine nucleotide binding properties of rap1 purified from human neutrophils*. Biochem. J., 1990. **267**(2): p. 407-0.
92. Bokoch, G.M., et al., *Inhibition of Rap1A binding to cytochrome b558 of NADPH oxidase by phosphorylation of Rap1A*. Science, 1991. **254**(5039): p. 1794-6.
93. Hu, C.D., et al., *Effect of phosphorylation on activities of Rap1A to interact with Raf-1 and to suppress Ras-dependent Raf-1 activation*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 48-51.
94. Rehmann, H., et al., *Structure of Epac2 in complex with a cyclic AMP analogue and RAP1B*. Nature, 2008. **455**(7209): p. 124-127.

95. Scrima, A., et al., *The Rap-RapGAP complex: GTP hydrolysis without catalytic glutamine and arginine residues*. EMBO J, 2008. **27**(7): p. 1145-53.
96. Jacobson M.P., P.D.L., Rapp C.S., Day T.J., Honig B., Shaw D.E., Friesner R.A., *A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004. **55**(2): p. 351-367.
97. Kaminski, G.A., Friesner, R.A., Tirado-Rives, J., Jorgensen, W.L., *Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides*. The Journal of Physical Chemistry B, 2001. **105**(28): p. 6474-6487.
98. Gallicchio E., Z.L., Levy R.M., *The SGB/NP hydration free energy model based on the surface generalized born solvent reaction field and novel nonpolar hydration free energy estimators*. Journal of Computational Chemistry, 2002. **23**(5): p. 517-529.
99. Ghosh, A., C.S. Rapp, and R.A. Friesner, *Generalized Born Model Based on a Surface Integral Formulation*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(52): p. 10983-10990.
100. Otwinowski, Z.a.M., W., *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*, in *Methods in Enzymology*, J.R.M.S. Carter, Eds., Academic Press (New York). Editor. 1997. p. 307-326.
101. Pflugrath, J.W., *The finer things in X-ray diffraction data collection*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999. **55**(Pt 10): p. 1718-25.
102. Adams, P.D., et al., *PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002. **58**(Pt 11): p. 1948-54.
103. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software*. J Appl Crystallogr, 2007. **40**(Pt 4): p. 658-674.
104. Murshudov, G.N., A.A. Vagin, and E.J. Dodson, *Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1997. **53**(Pt 3): p. 240-55.
105. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
106. Medina, D.L. and P. Santisteban, *Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell systems*. Eur J Endocrinol, 2000. **143**(2): p. 161-178.
107. Salomon, Y., C. Londos, and M. Rodbell, *A highly sensitive adenylate cyclase assay*. Anal Biochem, 1974. **58**(2): p. 541-8.
108. Tsutsui, Y. and P.L. Wintrode, *Hydrogen/deuterium exchange-mass spectrometry: a powerful tool for probing protein structure, dynamics and interactions*. Curr Med Chem, 2007. **14**(22): p. 2344-58.
109. Herrmann, C., et al., *Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6794-800.
110. Modha, R., et al., *The Rac1 polybasic region is required for interaction with its effector PRK1*. J Biol Chem, 2008. **283**(3): p. 1492-500.
111. Philips, M.R., *Compartmentalized signalling of Ras*. Biochem. Soc. Trans., 2005. **33**(Pt 4): p. 657-661.

112. Nomura, K., et al., *Identification of a novel domain of Ras and Rap1 that directs their differential subcellular localizations*. J Biol Chem, 2004. **279**(21): p. 22664-73.
113. Gorfe, A.A., B.J. Grant, and J.A. McCammon, *Mapping the nucleotide and isoform-dependent structural and dynamical features of Ras proteins*. Structure, 2008. **16**(6): p. 885-96.
114. Grant, B.J., A.A. Gorfe, and J.A. McCammon, *Ras conformational switching: simulating nucleotide-dependent conformational transitions with accelerated molecular dynamics*. PLoS Comput Biol, 2009. **5**(3): p. e1000325.
115. Abankwa, D., et al., *A novel switch region regulates H-ras membrane orientation and signal output*. EMBO J, 2008. **27**(5): p. 727-35.
116. Prior, I.A., et al., *GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(4): p. 368-75.
117. Harding, A. and J.F. Hancock, *Ras nanoclusters: combining digital and analog signaling*. Cell Cycle, 2008. **7**(2): p. 127-34.
118. Murakoshi, H., et al., *Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7317-22.
119. Plowman, S.J., et al., *Electrostatic interactions positively regulate K-Ras nanocluster formation and function*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(13): p. 4377-85.
120. Tian, T., et al., *Plasma membrane nanoswitches generate high-fidelity Ras signal transduction*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 905-14.
121. Bivona, T.G., et al., *PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis*. Mol Cell, 2006. **21**(4): p. 481-93.
122. Arai, Y., et al., *Dynamic polymorphism of Ras observed by single molecule FRET is the basis for molecular recognition*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(3): p. 809-15.
123. Ito, Y., et al., *Regional polysterism in the GTP-bound form of the human c-Ha-Ras protein*. Biochemistry, 1997. **36**(30): p. 9109-19.
124. Spoerner, M., et al., *Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 4944-9.
125. Spoerner, M., et al., *Slow conformational dynamics of the guanine nucleotide-binding protein Ras complexed with the GTP analogue GTP γ S*. FEBS Journal, 2007. **274**(6): p. 1419-1433.
126. Hubberstey, A.V. and E.P. Mottillo, *Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization*. FASEB J, 2002. **16**(6): p. 487-99.
127. Farnsworth, C.L. and L.A. Feig, *Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(10): p. 4822-9.
128. Rodriguez-Viciana, P., et al., *Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras*. Cell, 1997. **89**(3): p. 457-67.
129. White, M.A., et al., *Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation*. Cell, 1995. **80**(4): p. 533-41.

130. Verheijen, M.H., et al., *Interdependent action of RalGEF and Erk in Ras-induced primitive endoderm differentiation of F9 embryonal carcinoma cells*. *Oncogene*, 1999. **18**(31): p. 4435-9.
131. Shima, F., et al., *Association of yeast adenylyl cyclase with cyclase-associated protein CAP forms a second Ras-binding site which mediates its Ras-dependent activation*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(1): p. 26-33.
132. Shima, F., et al., *Effect of association with adenylyl cyclase-associated protein on the interaction of yeast adenylyl cyclase with Ras protein*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(3): p. 1057-64.
133. Baum, B., W. Li, and N. Perrimon, *A cyclase-associated protein regulates actin and cell polarity during Drosophila oogenesis and in yeast*. *Curr Biol*, 2000. **10**(16): p. 964-73.
134. Benlali, A., et al., *act up controls actin polymerization to alter cell shape and restrict Hedgehog signaling in the Drosophila eye disc*. *Cell*, 2000. **101**(3): p. 271-81.
135. Noegel, A.A., et al., *Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of Dictyostelium discoideum and the requirements for subcellular localization*. *J Cell Sci*, 1999. **112**(19): p. 3195-3203.
136. Sultana, H., et al., *Microarray phenotyping places cyclase associated protein CAP at the crossroad of signaling pathways reorganizing the actin cytoskeleton in Dictyostelium*. *Experimental Cell Research*, 2009. **315**(2): p. 127-140.
137. Toda, T., et al., *Exploring the function of RAS oncogenes by studying the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Princess Takamatsu Symp*, 1986. **17**: p. 253-60.
138. Wigler, M., et al., *Studies of RAS function in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1988. **53 Pt 2**: p. 649-55.
139. Vojtek, A., et al., *Evidence for a functional link between profilin and CAP in the yeast S. cerevisiae*. *Cell*, 1991. **66**(3): p. 497-505.
140. Field, J., et al., *Cloning and characterization of CAP, the S. cerevisiae gene encoding the 70 kd adenylyl cyclase-associated protein*. *Cell*, 1990. **61**(2): p. 319-27.
141. Gerst, J.E., et al., *CAP is a bifunctional component of the Saccharomyces cerevisiae adenylyl cyclase complex*. *Mol. Cell. Biol.*, 1991. **11**(3): p. 1248-1257.
142. Freeman, N.L., et al., *An actin monomer binding activity localizes to the carboxyl-terminal half of the Saccharomyces cerevisiae cyclase-associated protein*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(10): p. 5680-5.
143. Freeman, N.L., et al., *A conserved proline-rich region of the Saccharomyces cerevisiae cyclase-associated protein binds SH3 domains and modulates cytoskeletal localization*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(2): p. 548-56.
144. Lambrechts, A., et al., *The mammalian profilin isoforms display complementary affinities for PIP2 and proline-rich sequences*. *EMBO J*, 1997. **16**(3): p. 484-494.
145. Vaduva, G., N.C. Martin, and A.K. Hopper, *Actin-binding verprolin is a polarity development protein required for the morphogenesis and function of the yeast actin cytoskeleton*. *J Cell Biol*, 1997. **139**(7): p. 1821-33.
146. Hubberstey, A., et al., *Mammalian CAP interacts with CAP, CAP2, and actin*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 1996. **61**(3): p. 459-466.

147. Freeman, N.L. and J. Field, *Mammalian homolog of the yeast cyclase associated protein, CAP/Srv2p, regulates actin filament assembly*. Cell Motil Cytoskeleton, 2000. **45**(2): p. 106-20.
148. Moriyama, K. and I. Yahara, *Human CAP1 is a key factor in the recycling of cofilin and actin for rapid actin turnover*. J Cell Sci, 2002. **115**(8): p. 1591-1601.
149. Imami, K., et al., *Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column*. Anal Sci, 2008. **24**(1): p. 161-6.
150. Dephoure, N., et al., *A quantitative atlas of mitotic phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10762-7.
151. Zahedi, R.P., et al., *Phosphoproteome of Resting Human Platelets*. Journal of Proteome Research, 2007. **7**(2): p. 526-534.
152. Hoffman, G.R., N. Nassar, and R.A. Cerione, *Structure of the Rho Family GTP-Binding Protein Cdc42 in Complex with the Multifunctional Regulator RhoGDI*. Cell, 2000. **100**(3): p. 345-356.
153. Scheffzek, K., et al., *The Rac-RhoGDI complex and the structural basis for the regulation of Rho proteins by RhoGDI*. Nat Struct Mol Biol, 2000. **7**(2): p. 122-126.
154. Paz, A., et al., *Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation*. Oncogene, 2001. **20**(51): p. 7486-93.
155. Rotblat, B., et al., *Galectin-1(L11A) Predicted from a Computed Galectin-1 Farnesyl-Binding Pocket Selectively Inhibits Ras-GTP*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3112-3118.
156. Elad-Sfadia, G., et al., *Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34922-30.
157. Shalom-Feuerstein, R., et al., *K-Ras Nanoclustering Is Subverted by Overexpression of the Scaffold Protein Galectin-3*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6608-6616.
158. Belanis, L., et al., *Galectin-1 is a novel structural component and a major regulator of h-ras nanoclusters*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(4): p. 1404-14.
159. McAvoy, T., et al., *Phosphorylation of Rap1GAP, a striatally enriched protein, by protein kinase A controls Rap1 activity and dendritic spine morphology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3531-6.
160. Steinberg, S.F. and L.L. Brunton, *COMPARTMENTATION OF G PROTEIN-COUPLED SIGNALING PATHWAYS IN CARDIAC MYOCYTES*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2001. **41**(1): p. 751-773.
161. Beavo, J.A. and L.L. Brunton, *Cyclic nucleotide research [mdash] still expanding after half a century*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 710-718.
162. Michel, J.J.C. and J.D. Scott, *AKAP MEDIATED SIGNAL TRANSDUCTION*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2002. **42**(1): p. 235-257.

“And when your deepest thoughts are broken, keep on dreaming boy,
cause when you stop dreamin' it's time to die...”

~Blind Melon