

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Caracterização parcial e localização subcelular de um fator de
troca de nucleotídeos guanina associado à proteína Ras
(RasGEF1b) induzido por agonistas de receptores do tipo *Toll***

Warrison Athanásio Coelho de Andrade

Belo Horizonte
2008

Warrison Athanásio Coelho de Andrade

Caracterização parcial e localização subcelular de um fator de troca de nucleotídeos guanina associado à proteína Ras (RasGEF1b) induzido por agonistas de receptores do tipo *Toll*

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli

Co-orientadora: Dra. Viviane Alves Gouveia

Belo Horizonte
2008

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos de alegria e de luta. Nos momentos em que tudo parecia incerto e no qual pensava que o melhor era abandonar tudo e buscar novos caminhos, ele me amparou e ajudou a tomar a correta decisão, continuar na pesquisa, que apesar de todas as dificuldades, tenho grande prazer em fazê-la.

Agradeço aos meus pais, Geraldo e Vera pelo constante apoio e confiança que sempre depositaram em mim, mesmo que muitas das vezes eu não merecesse tanto. Apesar de até hoje não entenderem muito bem o que faço, e sempre me perguntarem, “Com o que você trabalha mesmo? E aí, já descobriu a cura de algo?”, nunca deixaram de me apoiar.

Obrigada Fernanda, Karina e Kenia, minhas queridas irmãs que foram minhas companheiras em Belo Horizonte, ou mesmo a distância, e que sempre me ajudaram em todos os problemas e ajudaram a amenizar a saudade de casa. E aos meus cunhados, que apesar de cunhados, são muito gente boa.

Agradeço ao meu Orientador Ricardo Gazzinelli por ter me dado à oportunidade de trabalhar em um grande laboratório, cercado de pessoas competentes, e de trabalhar em grandes projetos nos quais aprendi as mais variadas técnicas de laboratório.

Agradeço a minha co-orientadora Viviane Gouveia pelos novos ensinamentos que foram me passados com extrema competência e por ter “paciência” com minha total tranquilidade nos momentos de estresse.

Agradeço também aos amigos do Laboratório de Imunoparasitologia e Imunopatologia, aos ainda presentes, Alexandre, Érica, Miró, Mirinha do Mal, Polidoro, Policarpo, Bruno, Flávinha, Héliida, Genice, Mirla, Bárbara, Samanta, Meire, Marco(s), Michelle, Carla e aos não aqui presentes, Soraia, Bráulia, Bernardo e Dani. Um agradecimento especial para Eneida por nós agüentar com todas nossas bagunças e por fazer nosso laboratório funcionar em perfeitas condições. Acreditem, não estamos no 1º mundo mais isso é possível.

Apesar de falarem que sou chato é que a única coisa que faço é “encher saco”, também agradeço as minhas companheiras de trabalho Carol e Ana Paula, se faço isso é porque gosto de vocês. Obrigado pelos momentos de descontração e pelos sorrisos que vocês nos fazem dar com suas “doideras”. Como já lhes disse, vocês não são normais!!

Obrigado ao professor e nosso colaborador Aristobolo Silva pela ajuda nos experimentos.

Um grande abraço aos meus amigos de faculdade por estarem comigo durante esses últimos seis anos, e mais do que isso, juntos em todos os trabalhos que nos permitiam. Um abraço pra galera da turma de bases 2007 que ajudou a superar aqueles 3 meses de estresse total. Em especial a Luara por agüentar minha amolação e pela grande ajuda nos experimentos de fluorescência e FACS.

Obrigado ao Dr. Paulo Pimenta pela permissão da utilização do Microscópio Confocal de seu laboratório, e a técnica Fernanda pela ajuda na manipulação do equipamento. Como você mesma disse, apanhamos e aprendemos juntos.

Um grande abraço também para meus grandes amigos da Galera do Budjorge que sempre estiveram presente nos momentos de descontração, carnavais e churrascos para aliviar o estresse.

Todos vocês fizeram parte dessa conquista. OBRIGADO!!!

Epígrafe

*I have climbed the highest mountains
I have run through the fields
I have run I have crawled
I have scaled these city walls
But I still haven't found what I'm looking for*

Bono Vox-U2

Resumo

Os fatores de troca de nucleotídeos guanina da proteína Ras (RasGEFs) são componentes celulares essenciais no processo de ativação das RasGTPases em resposta a diversos estímulos extracelulares. O *rasGEF1b* é um fator de troca de nucleotídeos guanina (GEF) altamente conservado. A expressão do RNAm do *rasGEF1b* em macrófagos é induzida por diferentes agonistas de receptores do tipo *Toll* (TLRs), tais como LPS (TLR4), GPI-mucin (TLR2) e Poli I:C (TLR3). A predição da provável localização subcelular da proteína RasGEF1b foi realizada inicialmente por meio de análises de bioinformática. A expressão da proteína recombinante em células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pFLAGCMV2-RasGEF1b, e análise por *Western Blotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-FLAG, demonstrou uma proteína de massa molecular aparente de 56kDa. Pela técnica de centrifugação diferencial, células HEK 293T foram fracionadas e as diferentes frações foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos, dirigidos contra proteínas das mesmas; utilizando esta metodologia, demonstramos que a proteína FLAGRasGEF1b está presente em maior abundância nas frações de núcleo e membranas pesadas. O DNA do FLAGRasGEF1b foi inserido em um plasmídeo em fusão com as proteínas fluorescentes mRFP ou YFP, e por microscopia confocal demonstramos a localização da proteína em endossomos primários e endolisossomos. Pela técnica de RNA de interferência (RNAi), inibimos a expressão da proteína recombinante FLAGRasGEF1b-YFP. Além disso, demonstramos que RasGEF1B é capaz de atuar como fator de troca de guaninas de Ras quando expressa em células HEK 293T *in vitro*.

Abstract

The guanine nucleotide exchange factors of the Ras protein super family (RasGEFs) are essential cellular components in the process of Ras activation in response to diverse extra cellular stimuli. The *rasGEF1b* is a highly conserved guanine exchange factor (GEF). In macrophages expression of *rasGEF1b* mRNA is induced by different TLRs agonists, such as LPS (TLR4), GPI-mucin (TLR2) and Poli I: C (TLR3). First, by using bioinformatics tools we analyzed the probable RasGEF1b subcellular localization. The pFLAGCMV2 encoding the recombinant protein FLAGRasGEF1b was used to transfect HEK 293T cells and protein expression evaluated by Western Blot using an anti-FLAG mAb, it showed a protein with apparent molecular weight of 56kDa. By using differential centrifugation, HEK 293T cells were fractioned and the different fractions were recognized using monoclonal antibodies specific to protein of them, using this methodology, we showed that the protein FLAGRasGEF1b was present mostly in the nuclear and heavy membrane fractions. The FLAGRasGEF1b was inserted into a plasmid in fusion with mRFP or YFP fluorescent proteins, and by using confocal microscopy we showed that the proteins were present at early endosome and endolysosome. By using RNA interference (RNAi) we inhibit the expression of FLAGRasGEF1b-YFP, which was capable to activate Ras in HEK 293T cells in vitro.

Lista de Figuras

- Figura1.** Esquema da ativação/inativação de Ras por GEFs/GAPs.
- Figura2.** Esquema da sinalização via Ras
- Figura3.** Modelagem computacional da estrutura terciária da proteína RasGEF1b.
- Figura4.** Representação esquemática do vetor de clonagem pFLAGCMV2.
- Figura5.** Representação simplificada do vetor pLKO.1 utilizado nos experimentos de RNAi.
- Figura6.** Análise comparativa da homologia entre as proteínas hipotéticas humana e murina codificadas pelo gene *rasGEF1b*.
- Figura7.** Análise por *Western Blotting* das frações subcelulares de células HEK 293T expressando FLAGRasGEF1b.
- Figura8.** Amplificação por PCR da região codificadora de FLAGRasGEF1b.
- Figura9.** Perfil de restrição enzimática de FLAGRasGEF1b clonado no vetor pCR 2.1TOPO.
- Figura10.** Perfil de restrição enzimática de FLAGRasGEF1b clonado nos vetores pcDNA3-YFP e pcDNA3-mRFP.
- Figura11.** Marcação por imunofluorescência da expressão de FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b-mRFP em células HEK 293T.
- Figura12.** Marcação por imunofluorescência da expressão de YFP e mRFP em células HEK 293T e células não transfectadas.
- Figura13.** Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal.
- Figura14.** Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal.
- Figura15.** Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal.
- Figura16.** Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal.
- Figura17.** Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal.

Figura18. Imagens de microscopia confocal de células CHO não transfectadas.

Figura19. Imagens por microscopia de fluorescência da inibição da expressão de FLAGRasGEF1b-YFP por RNAi.

Figura20. Análise por citometria de fluxo da inibição da expressão de FLAGRasGEF1b-mRFP por RNAi.

Figura21. Ensaio de ativação de Ras pelas proteínas FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b.

Figura22. Expressão e purificação da proteína recombinante His6-RasGEF1b (SDS-PAGE 12%).

Figura23. Análise por ELISA e *Western blotting* da produção de anticorpos policlonais dirigidos contra a proteína recombinante His6-RasGEF1b

Lista de Abreviaturas

BSA - *Bovine Serum Albumin*

cDNA - DNA complementar

DNA - ácido desoxirribonucléico

DDRT-PCR - *Differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction*

DTT - ditioneitol

EDTA - *EthyleneDiamineTetrAcetic acid*

EGFR- *Epidermal growth factor receptor*, receptor do fator epitelial de crescimento

ERK- *Extracellular signal-regulated kinase*

FACS - *Fluorescence-activated cell-sorting*

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

GPI - glicosilfosfatidilinositol

h - hora (s)

IL - interleucina

INF- γ - interferon gamma

iNOS - *Inducible nitric oxide synthase*, Oxido nítrico sintase
indutível

JNK- *Jun N-terminal kinase*

LB- Meio Luria-Bertani

LPS - Lipopolissacárideo derivado de bactéria gram-negativa

M - molar

MCP-1 - *Monocyte chemotactic protein-1*

μg - micrograma

μL - microlitro

mM - milimolar

mRFP - *monomeric Red Fluorescent Protein*

PAMPs - *Pathogen-associated molecular patterns*, Padrões
moleculares associados à patógenos

pb - pares de bases

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR – *Polimerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase

Poli I:C - ácido poli-inosínico-poli-citidílico

PMSF - *Phenylmethanesulphonylfluoride*

PVDF - *Polyvinylidene fluoride*

RNAi - RNA de interferência

RNAm - RNA mensageiro

SDS-PAGE-Gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio

TAE - Tampão Tris-acetato EDTA

TEMED-*Tetramethylethylenediamine*

TLR-*Toll like receptor*, Receptores do tipo *Toll*

TNF - Fator de necrose tumoral

U.V. - Ultravioleta

V – Volts

x g - Gravidade

YFP - *Yellow Fluorescent Protein*

Sumário

1. Introdução

1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a imunopatogênese da Doença de Chagas.....	14
1.2 Glicosilfosfatidilinositol (GPI) e sinalização via <i>Toll</i>	15
1.3. <i>Small GTPases</i>	16
1.4 Proteínas Ras e regulação da expressão gênica	19
1.5 GEFs - <i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>	22
1.5.1 Família do domínio RasGEF1.....	24

2. Justificativa	26
-------------------------------	-----------

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28

4. Materiais e Métodos

4.1 Análise da proteína RasGEF1b utilizando ferramentas de bioinformática.....	29
4.2 Cultivo celular.....	29
4.3 Transfecção das células HEK 293T com <i>FLAGRasGEF1b</i>	29
4.4 Fracionamento subcelular.....	30
4.5 <i>Western blotting</i> das frações subcelulares.....	31
4.6 Amplificação da região codificadora do DNA de <i>FLAGRasGEF1b</i>	32
4.7 Clonagem no vetor pCR® 2.1TOPO	32
4.8 Preparação de DNA plasmidial.....	33
4.9 Clonagem nos vetores de expressão eucariótica pcDNA3-YFP e pcDNA3-mRFP.....	34
4.10 Experimentos de microscopia confocal.....	34
4.11 Experimentos de RNA de interferência	36
4.12 Ensaio de ativação de Ras pela proteína recombinante <i>FLAGRasGEF1b</i>	38
4.13 Expressão e purificação da proteína recombinante His6-RasGEF1b.....	39

4.14 SDS-PAGE.....	40
4.15. Produção de soro imune de coelho dirigido contra His6-RasGEF1b.....	40
4.16. ELISA e <i>Western Blotting</i> com soro dos coelhos.....	41
5. Resultados	42
6. Discussão	65
7. Conclusão	71
8. Perspectivas	72
9. Referências	74

Introdução

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a imunopatogênese da Doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* (Mastigophora, Kinetoplastidae) é um parasita intracelular obrigatório causador da Doença de Chagas, cuja endemia na América Latina atinge cerca de 18 milhões de pessoas. O ciclo de vida do parasito apresenta quatro estágios evolutivos: dois replicativos e dois infectivos. No hospedeiro invertebrado, triatomíneo (Reduviidae, Hemiptera), os epimastigotas dividem-se no intestino médio e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos, fase infectante, que são eliminados nas fezes e urina do triatomíneo após o repasto sanguíneo. Através de lesões na pele do hospedeiro vertebrado, os parasitas penetram e infectam células vizinhas diferenciando-se em amastigotas. Após a replicação, os amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que rompem às células, alcançam a corrente sanguínea e atingem outras células, espalhando a infecção. Esses tripomastigotas sanguíneos podem ser ingeridos pelo vetor e reiniciar a infecção (1). A Doença de Chagas caracteriza-se por uma fase aguda, determinada pela presença intensa de parasitas na circulação sanguínea e nos tecidos dos indivíduos afetados, acompanhados de sintomas fisiológicos, como por exemplo, a miocardite. Esta fase pode ser seguida por uma fase crônica que apresenta um baixo nível de parasitas nos tecidos, porém sem a manifestação dos sintomas observados na fase aguda. Entretanto, em alguns pacientes o estágio assintomático da Doença de Chagas pode evoluir para um estágio sintomático caracterizado pelo alargamento do coração e denervação da musculatura lisa do tubo digestivo (2, 3). Embora vários estudos tenham sido focalizados nos aspectos imunológicos dos pacientes e de modelos experimentais, os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da doença pelo *T. cruzi* estão sendo investigados e ainda por serem elucidados.

1.2 Glicosilfosfatidilinositol (GPI) e sinalização via *Toll*

A compreensão detalhada da participação do *T. cruzi* na resposta imune-celular da Doença de Chagas tornou-se possível a partir da identificação e caracterização de moléculas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que são abundantes na membrana do parasito (4). As moléculas GPI derivadas de glicoproteínas da forma tripomastigota do *T. cruzi* (tGPI) são capazes de ativar as funções efetoras dos macrófagos como produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico (5 - 7). De fato, descreveu-se recentemente que o potente caráter ativador da tGPI deve-se a sua estrutura molecular bem definida, sendo uma das características a cauda lipídica formada predominantemente por ácidos graxos insaturados, que foram capazes de ativar um membro da família dos receptores do tipo *Toll* (TLR *toll-like receptor*) (7, 8). Os dados desse trabalho sugerem que a ativação do TLR2 por tGPI é o evento responsável pela resposta imune do hospedeiro causada pelo parasita na Doença de Chagas (8).

Após a caracterização do primeiro TLR de mamífero, o TLR4, outras várias proteínas estruturalmente relacionadas foram identificadas como TLRs. Os TLRs de mamíferos compreendem uma grande família com pelo menos 11 membros, sendo que TLR1-9 são conservados em *Mus musculus* e *Homo sapiens* (9).

Trabalhos recentes mostram que o desenvolvimento da resposta imune adquirida é determinado pelo reconhecimento inicial dos antígenos durante a resposta imune inata. Um grande avanço ocorreu com a descoberta de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) que podem ser reconhecidos por receptores celulares como *Toll*. Tem sido constantemente demonstrado que esta família de receptores é a principal maneira pela qual o sistema imune inato reconhece e responde à presença de microorganismos e de outros agentes infecciosos (10, 11). O lipopolissacarídeo (LPS), a flagelina de *Salmonella typhimurium* e as seqüências de DNA ricas em CpG são PAMPs associados à infecção bacteriana; enquanto o RNA de fita dupla (dsRNA) em sua forma sintética (poly[rI]:poly[rC] ou poly-IC, *polyriboinosinic:polyribocytidilic acid*) ou formado a partir de intermediários da replicação, representam moléculas característica de uma infecção viral. Âncoras de GPI derivadas da membrana das formas tripomastigotas, são moléculas presentes no protozoário *T. cruzi* e são responsáveis por iniciar uma resposta inflamatória. Por exemplo, o LPS é reconhecido por TLR4, o CpG por TLR9, o poly-IC por TLR3, as flagelinas por TLR5 e as âncoras tGPI de *T. cruzi* por TLR2 (8, 12). Uma vez ativados, os TLRs iniciam cascatas de sinalização que

regulam a expressão de um grande número de genes incluindo os que codificam citocinas pró-inflamatórias e proteínas citoplasmáticas envolvidas na ativação de outras vias celulares. Uma variedade de estímulos dependentes ou não-dependentes da estimulação dos TLRs pode levar à ativação do NF- κ B. Na resposta imune celular mediada por TLRs é razoável afirmar que a grande maioria dos genes regulados positivamente pelo NF- κ B terá um impacto fundamental na resposta inflamatória como a secreção das citocinas IL-12 e TNF- α por exemplo. Entretanto, proteínas predominantemente citoplasmáticas e que são reguladas pelo NF- κ B também podem ser efetores fundamentais da resposta imune celular. Dados recentes demonstraram que em macrófagos estimulados com GPI mucina, é induzida a expressão de vários genes provavelmente envolvidos na resposta inflamatória desencadeada na infecção por *T. cruzi*. (13 - 15). Dentre esses genes, foi identificado um novo gene que codifica um fator de troca de nucleotídeos guanina (*rasGEF1b*), inicialmente denominado *gpi γ 4*, que potencialmente regularia a atividade de membros da família RasGTPase. A expressão deste GEF é regulada pelo NF- κ B (Silva, AM dados não publicados), e elementos para este fator de transcrição foram encontrados na provável região promotora de *rasGEF1b* (15).

1.3- Small GTPases

Mais de 100 *small G proteins* foram identificadas em eucariotos da levedura ao homem. São proteínas G monoméricas com massas que variam de 20 a 25 kDa e compreendem uma superfamília. A superfamília Ras dos humanos possui aproximadamente 154 membros que são estruturalmente classificados e agrupados em 5 famílias principais: Ras, Rho, Rab, Arf e Ran. Estas proteínas controlam uma grande variedade de processos celulares. Os membros da família Ras (proteínas Ras) têm como função principal a regulação de uma variedade de vias de sinalização, resultando na transcrição, diferenciação e proliferação celular; as proteínas da família Rho (proteínas Rho, Rac e Cdc42) estão envolvidas na regulação da forma celular, reorganização do citoesqueleto e migração celular; os membros da família Rab e Arf (proteínas Rab e Arf) regulam os processos associados às vesículas, incluindo a formação e transporte para exocitose; e os membros da família Ran (proteína Ran) regulam o transporte núcleo-citoplasmático, formação do envelope nuclear e organização de microtúbulos durante o ciclo celular (16 – 18).

A comparação das seqüências de aminoácidos das proteínas Ras de várias espécies revelou que todas possuem estruturas primárias conservadas e têm de 30 a 55% de homologia entre si. Possuem seqüência de aminoácidos consenso responsável pela interação específica com GDP e GTP e para atividade GTPase, que hidrolisa o GTP ligado à GDP. Além disso, possuem uma região para interação com proteínas efetoras. As proteínas das famílias Ras, Rho/Rac/Cdc42 e Rab possuem seqüências no C-terminal que sofrem modificações pós-traducionais lipídicas, como farnesil, geranylgeranyl, palmitoil, e também adição de metil que pode resultar em proteólise (16). As modificações lipídicas são necessárias para a ligação às membranas celulares e/ou componentes reguladores, sendo necessárias para ativação das proteínas efetoras. Análises cristalográficas e de NMR mostraram que muitas *small GTPases* possuem domínios de ligação à GDP/GTP com estrutura de topologia similar (16).

De acordo com a estrutura, estas proteínas possuem duas formas interconvertíveis: uma inativa ligada à GDP, e outra ativa ligada à GTP. Um sinal *upstream* estimula a dissociação do GDP ligado à GTPase, levando a uma drástica mudança conformacional na região de ligação à molécula efetora, permitindo que ocorra a interação com o efetor. A conversão da forma GTP-ligada à GDP-ligada ocorre pela atividade GTPase intrínseca das *small GTPases*, desfazendo a interação com a molécula efetora. Desta forma, ocorre um ciclo de ativação/inativação, e as proteínas *small GTPases* funcionam como interruptores moleculares que transmitem um sinal extracelular/intracelular para uma molécula efetora (16, 18, 19).

O passo limitante da troca de GDP por GTP é a dissociação do GDP ligado. Esta reação é extremamente lenta e então é estimulada pelo fator de troca de guaninas – GEF (*Guanine exchange factor*), cuja atividade é frequentemente regulada por um sinal *upstream*. O GEF inicialmente interage com a forma GDP-ligada e libera o GDP para formar um complexo binário *Small GTPase* - GEF. A seguir, GEF é substituído por GTP, que se encontra em excesso molar no meio intracelular maior que GDP, originando a forma GTP-ligada (Figura 1). A maioria dos GEFs, como Sos (*Son of Sevenless*), que é um RasGEF, e Rab3GEF, são específicos para os membros das famílias de *Small GTPases* correspondentes, mas alguns GEFs atuam sobre vários substratos. Além disso, a reação de troca GDP/GTP para as proteínas Rho/Rac/Cdc42 e Rab é regulada por outro tipo de molécula, chamada GDI (*Guanine Dissociation Inhibitor*). Este tipo de regulador inibe a dissociação do GDP-ligado fazendo com que a *Small GTPase* permaneça ligada ao GDP (16).

As *Small GTPases* possuem atividade GTPase basal (GTP a GDP) que é variável e muito lenta, sendo uma atividade intrínseca auto-limitante. A atividade catalítica dessas proteínas é acelerada por uma classe de proteínas acessórias conhecidas com proteínas ativadoras de GTPase (GAPs). As GAPs são específicas para cada membro ou subfamília de *Small GTPases*, mas algumas são ativas sobre vários substratos (16, 19)

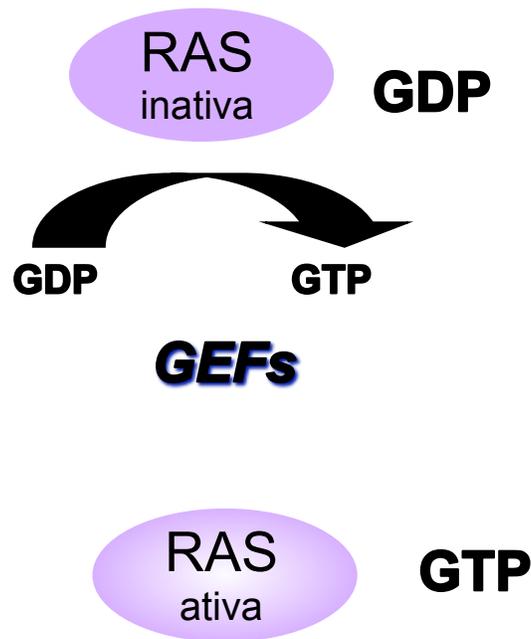


Figura 1. Esquema da ativação/inativação de Ras por GEFs/GAPs. Proteínas Ras se tornam ativas quando ligadas a GTP e inativas quando ligadas a GDP. O processo de quebra de GTP em GDP é acelerado pelas GAPs, sendo que o GEF se liga ao complexo Ras-GDP liberando o GDP e deixando o sitio livre para GTP.

Assim como as proteínas G heterotriméricas, as *Small GTPases* estão presentes apenas nos eucariotos, apesar das proteínas G envolvidas com a síntese de proteínas existirem em procariotos e eucariotos. A maioria das *Small GTPases* estão presentes na maioria das células dos mamíferos, e a maioria delas possui as famílias Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf e Ran; entretanto, os níveis de expressão dos membros destas famílias variam entre os tipos celulares. A maioria das GTPases é citoplasmática e/ou nuclear, sendo cada uma localizada em uma membrana específica e esta localização é mediada pelas modificações lipídicas (16).

1.4- Proteínas Ras e regulação da expressão gênica.

Três proteínas Ras são conhecidas, H-Ras, K-Ras e N-Ras, que quando ativadas por mutação são capazes de transformar células de mamíferos. Em *Saccharomyces cerevisiae* existem 2 membros das proteínas Ras, Ras1 e Ras2, que são essenciais para a viabilidade celular e que são funcionalmente substituídas pelos genes de mamíferos (16).

Estudos em *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* e células de mamíferos estabeleceram o modo de ação das proteínas Ras, ligando-se diretamente e ativando a proteína quinase Raf. Raf induz a expressão gênica via MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) em resposta a vários estímulos extracelulares. Outros estudos demonstraram que as proteínas Ras regulam, além da proliferação celular, a diferenciação, morfologia e apoptose. Outra característica marcante é a capacidade das proteínas Ras levarem a diferentes tipos de cânceres, pela mutação de seus genes e de genes que regulam sua função. Versões mutadas de três genes Ras humanos foram detectados em ~15% de todos os tumores humanos, tornando importante a função das proteínas Ras aberrantes na carcinogênese (16, 18).

As proteínas Ras estão localizadas na face citosólica das membranas celulares e acredita-se que esta localização é absolutamente necessária para a atividade biológica. Essas proteínas não são intrínsecas às membranas; são sintetizadas como proteínas hidrofílicas no citosol e, após uma série de modificações pós-tradução como prenilação, proteólise e carboxi-metilação, são direcionadas para as membranas celulares (20).

As Ras GTPases são membros originais de uma classe de proteínas que apresentam o motivo CAAX, no qual C é cisteína, A é normalmente, mas nem sempre, um aminoácido alifático e X é qualquer aminoácido. A seqüência CAAX é reconhecida por preniltransferases, farnesiltransferases (FTase) ou geranylgeranyltransferase tipo I (GGTase I). Estas modificações culminam com a criação de um domínio hidrofóbico no domínio C-terminal de Ras que medeia à associação com o retículo endoplasmático, onde as proteínas desta subfamília são re-processadas e transportadas às membranas celulares (endomembranas ou membrana plasmática). Desta forma, as proteínas Ras, antes consideradas estacionárias, trafegam entre os compartimentos celulares (19, 21).

A atividade das Ras é regulada pelos GEFs e GAPs, e a ativação é induzida por vários sinais extracelulares, principalmente aqueles que ativam receptores com atividade tirosina cinase intrínseca ou através de cinases associadas ao receptor. As fosfotirosinas servem como sítio de

ancoragem para proteínas adaptadoras como Grb2, que recruta Sos, a RasGEF mais bem caracterizada, do citosol. Sos é recrutada para a membrana plasmática, formando um complexo receptor-adaptador-GEF, e estimula a proteína Ras localizada no lado citoplasmático da membrana, convertendo-a na forma GTP-ligada a partir da GDP-ligada. Receptores que não se associam diretamente com tirosina cinases, como receptores de células T, por exemplo, podem ativar as proteínas Ras indiretamente através de tirosinas cinases tipo Src ou ativação de receptores tirosina cinase ligante-independentes. Após as proteínas Ras-GTP executarem suas funções junto aos seus efetores, são convertidas na forma ligada a GDP pela ação das RasGAPs (16).

As proteínas Ras medeiam seus efeitos sobre a proliferação celular principalmente através da ativação da via de sinalização Raf (c-Raf, A-Raf e B-Raf) - MEK (MKK1 e 2) - MAP cinase (MAPK)(Figura 2)(16).

A via de sinalização regulada por Ras melhor caracterizada ocorre através das MAPKs Erk1 e Erk2. Esta via é ativada quando qualquer um dos vários fatores de crescimento recruta seus receptores cognatos com atividade tirosina cinase (PTKRs). A ligação dos PTKRs promove a sua dimerização, permitindo a fosforilação cruzada dos resíduos de tirosina nos domínios citosólicos, catalisada pela atividade cinase intrínseca a este domínio (22). Estes resíduos de fosfotirosina servem como sítios de ancoragem das moléculas sinalizadoras e proteínas adaptadoras que contêm domínios SH2 (*Src Homology domain*) ou PTB (*PhosphoTyrosine-Binding*). Entre estas está a proteína adaptadora Grb2 que se liga constitutivamente a Sos pelo domínio SH3. Então, a fosforilação dos PTKRs leva ao recrutamento de Sos para a membrana plasmática onde encontra Ras (19). A interação de Raf com Ras-GTP é mediada pelos domínios RBD e CRB, no N-terminal (16).

Uma vez que Ras é ativada na membrana, esta recruta Raf-1 (serina/treonina cinase) para este compartimento. A atividade quinase de Raf-1 é ativada quando ocorre sua associação a membranas através de um conjunto complexo de eventos regulatórios ainda pouco entendidos (23). Por fosforilação, Raf-1 ativa a cinase de ERK1/2 (MEK1), uma tirosina/treonina cinase, que por sua vez fosforila e ativa Erk1 e Erk2. As proteínas Erk são serina/treonina cinases que possuem numerosos substratos, incluindo proteínas citosólicas como a S6 quinase ribossomal p90. Uma vez fosforilada, ERK1/2 formam dímeros que são transportados para o núcleo, onde fosforilam a família de fatores de transcrição Ets (19).

1.5 – GEFs - *Guanine Nucleotide Exchange Factors*

O primeiro GEF de Ras descoberto foi Cdc25, identificado geneticamente em *S. cerevisiae*, possui domínio GEF na porção C-terminal, que é necessário para sua atividade catalítica e um domínio SH3 no N-terminal. Nos eucariotos superiores, além do Cdc25 de mamíferos (mCdc25), dois tipos de proteínas diferentes, homólogas à Cdc25 foram encontradas. O primeiro grupo inclui Sos, que foi identificado inicialmente em *Drosophila*. Homólogos de Sos, um humano e dois murinos, foram clonados. Sos possui um domínio de homologia à pleckstrina (PH) no N-terminal, que interage com o fosfolípido de membrana PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*), que determina sua localização; possui domínio GEF na porção central da proteína e um sítio de ligação à Grb2 no C-terminal. O segundo grupo inclui RasGRF que é expressa primariamente em tecidos neuronais. Possui os domínios PH e GEF; além disso, contém um motivo IQ que é regulado por calmodulina ligada a cálcio (16, 17).

Estas descobertas coincidiram com a identificação da RalGDS, Rap1 GEF, C3G, todas compartilhando homologia com domínio catalítico de Cdc25. Aproximadamente mais 20 novas proteínas com homologia a RasGEFs/Cdc25 foram descritas. A maioria foi identificada por busca baseada em homologia, nos bancos de dados do NCBI, enquanto outras por ensaios funcionais, dois híbridos e co-precipitação (17).

A característica comum dos RasGEF é o seu domínio catalítico ou domínio de homologia à Cdc25. Este domínio possui três regiões estruturalmente conservadas, scr1-3. Existem outras duas regiões conservadas que foram identificadas nos alinhamentos dos GEFs de mamífero e chamadas scr4 e 5. A estrutura cristalográfica do domínio catalítico de Sos demonstrou que scr 1-3 formam o bolso de ligação a Ras da GEF (24).

Os domínios catalíticos das várias famílias de GEFs não são relacionados estruturalmente e aproximam-se das proteínas G por diferentes ângulos. Entretanto, usam princípios similares para deformar o sítio de ligação do nucleotídeo. A ligação do GEF induz mudanças conformacionais que reduzem a afinidade do nucleotídeo (17, 18).

Os GEFs catalisam a dissociação do nucleotídeo ligado à proteína G pela modificação do sítio de ligação a nucleotídeos diminuindo a afinidade e desta forma o nucleotídeo é liberado e subsequentemente substituído. Em geral a afinidade da proteína G por GTP e GDP é similar; o aumento resultante da forma ligada a GTP sobre a ligada à GDP deve-se à concentração celular

aproximadamente dez vezes maior do GTP comparada ao GDP. A afinidade da proteína G pelo nucleotídeo ou por seu GEF é muito alta. A interação do GEF enfraquece a afinidade pelo nucleotídeo e vice-versa, o nucleotídeo enfraquece a afinidade pelo GEF. Durante a reação de troca o GEF desloca o nucleotídeo ligado e subsequentemente um novo nucleotídeo desloca o GEF (17, 18).

Foram desenvolvidos vários ensaios para determinar a atividade dos GEFs *in vivo*, baseados na medida quantitativa de Ras-GTP; e estes facilitaram a identificação de novos GEFs. As metodologias baseiam-se no fato de que os domínios de ligação a Ras (RBD) dos efetores de Ras ligam-se à Ras-GTP com pelo menos 100 vezes mais afinidade do que à Ras-GDP. Desta forma, uma proteína de fusão GST-RBD pode extrair Ras-GTP do lisado celular e ser detectada por imunoblot (25 - 27).

Quase todos os GEFs são proteínas com multidomínios reguladas de uma forma bastante complexa. Esta regulação inclui interações proteína-proteína ou proteína-lipídeo, ligação de segundos mensageiros e modificações pós-traducionais. Estas interações e modificações induzem pelo menos uma de três mudanças principais: translocação para um compartimento celular específico onde a proteína G está localizada, liberação da auto-inibição por domínio ou região flanqueadora, que esconde o sitio de ligação da proteína G, ou a indução de mudanças alostéricas no domínio catalítico (18).

Muitos RasGEFs foram identificados com base na sua habilidade em induzir transformação celular após super-expressão. Por exemplo, GRP1 foi isolada após a expressão de uma biblioteca de cDNA de linfoma de células T em fibroblastos e a super-expressão de muitas outras GEFs pode levar à transformação, indicando a potencial contribuição das GEFs no desenvolvimento do câncer. Enquanto as mutações de Ras são encontradas em ~15% dos tumores humanos, Ras selvagem também pode contribuir para a transformação, como resultado de sua superexpressão ou mediando os efeitos de aumento de crescimento causados por oncoproteínas. Sos também é parte desta via e a super-expressão desta GEF em linhagens de carcinoma renal pode levar a um aumento da ativação de Ras. A amplificação de Sos também tem um importante papel na carcinogênese do câncer de bexiga humano (17).

1.5.1- Família do domínio RasGEF1

Atualmente esta é uma família de GEFs constituída por 3 membros “a”, “b”, e “c”, cujos transcritos estão presentes em *Mus musculus* e no homem. RasGEF1a encontra-se em fase de caracterização, RasGEF1c ainda não foi caracterizado e RasGEF1b é o alvo de estudo deste trabalho.

Pouco se sabe sobre os membros RasGEF1a, RasGEF1b e RasGEF1c. A proteína GEF codificada pelo gene *rasgefa* é essencial para a agregação celular, agindo em nível de ativação da adenil-ciclase em *Dictyostelium*. Células de *Dictyostelium* sem o gene *rasgefb* apresentam desenvolvimento inicial prejudicado, embora elas eventualmente formem corpos de frutificação finos, mas normalmente proporcionais. Além disso, essas células se movem rapidamente de forma incomum e mostram severo prejuízo no crescimento celular. Mutantes para RasGEFA e RasGEFR não ativam RasC e RasG respectivamente (28, 29). Foi demonstrado em dados recentes que RasGEF1a tem sua expressão aumentada na maioria dos colangiocarcinoma intra-hepáticos e que sua inibição reduz o crescimento celular (30). A família de fatores de transcrição E2F regula uma série de funções celulares incluindo apoptose e diferenciação celular. Foi visto que E2F1 induz a ativação de ERK e a expressão de RasGEF1b *in vitro* em células de mamífero (31).

O *rasGEF1b* contém o domínio RasGEFN, um domínio do tipo Cdc25, um padrão de zíper de leucina (Figura 3), que está normalmente envolvido na associação entre proteínas, e três motivos de localização nuclear. Mais importante, parece ser o primeiro exemplo de um GEF cuja expressão é induzida e mantida durante o processo de ativação de macrófagos/linfócitos (15). AKAP13, uma proteína de ancoramento que possui atividade GEF, teve sua expressão induzida por agonista do receptor TLR2 e medeia a ativação de NF- κ B via TLR2 (32). Está bem estabelecido que as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) estão envolvidas na proliferação de linfócitos T durante a estimulação por mitógenos (33, 34), como também na síntese de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos expostos a agonistas dos receptores do tipo *Toll* (TLRs) (35, 36), apesar da exposição de macrófagos murinos a CpG induzir a ativação de Vav1 seguida da expressão de TNF- α e óxido nítrico sintase (iNOS), sem a ativação de MAPKs (37).

Embora Ras seja um passo inicial que desencadeia a fosforilação de algumas MAPKs, os eventos moleculares *upstream* que controlam a ativação dessas proteínas são desconhecidos. Contudo, a caracterização e localização celular do RasGEF1b poderá contribuir para um melhor

entendimento da ativação do sistema imune por parasitas, incluído o *T. cruzi*, e a patogênese da Doença de Chagas.

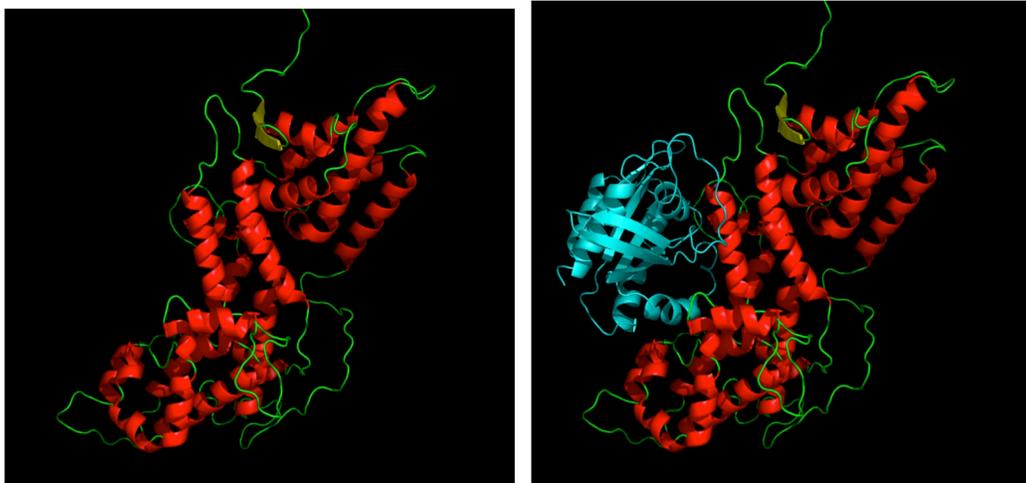


Figura 3. Modelagem computacional da estrutura terciária da proteína RasGEF1b. A modelagem de RasGEF1b foi feita utilizando o programa ESyPred3D e baseado da estrutura cristalográfica de Sos1. A esquerda está representado RasGEF1b e a direita RasGEF1b ligado a Ras. Em vermelho estão representados as alfa hélices, e verde as voltas e em amarelo as folhas betas. Em azul esta representada Ras.

2. Justificativa

Os fatores de troca de guanina, RasGEFs, são componentes celulares fundamentais no processo de ativação das RasGTPases em resposta à diversos estímulos extracelulares. Nos últimos anos uma série de Ras-GEFs foram identificados, porém estudos mais aprofundados devem ser realizados com o objetivo de determinar participação dessas proteínas na ativação de diferentes RasGTPases e em diferentes processos celulares *in vivo*. Em 2002 foi identificado um novo fator de troca de guaninas cuja expressão do RNAm foi significativamente induzida por GPI-mucinas (15). Esse novo gene, designado *GPIγ4*, teve sua expressão induzida em macrófagos murinos após o tratamento com GPI-mucinas de *T. cruzi*. Embora a expressão do *rasGEF1b* seja constitutiva em alguns órgãos como cérebro, pulmão e intestino, foi observado uma aumento significativo nos níveis de RNAm no timo, baço, rim, fígado, coração e em linfonódos vinte dias pós-infecção com *T. cruzi*. Esses resultados sugeriram que, no decorrer da Doença de Chagas, o *rasGEF1b* tenha um importante papel na ativação de outros componentes celulares e, conseqüentemente, no estabelecimento de uma resposta imune celular.

Durante a fase aguda da Doença de Chagas, o controle da parasitemia em camundongos parece ser dependente da atividade das células T maduras CD4+/CD8+ (3). Do mesmo modo, a ativação policlonal de células B e T pode surgir em decorrência da infecção por *T. cruzi* (38, 39). Interessante notar que já foi descrito que um RasGEF, o fator de troca de guanina RasGRP1, é responsável pela indução da maturação de tímócitos assim como produção de células T CD8+ em camundongos (40 - 42). Além disso, RasGRP1 teve sua expressão aumentada em células T negativas após estimulação do receptor de células T (TCR, *T cell receptor*). Da mesma forma, é possível que um aumento dos níveis de *rasGEF1b* no timo seja um evento chave na maturação e produção de células T, para que haja o controle efetivo dos níveis do *T. cruzi* observados na fase aguda da doença. Essas observações levam à especulação de que a regulação positiva de *rasGEF1b* em células do sistema imune pode resultar em um mecanismo de amplificação da resposta imune, o que acarretaria na resistência da célula hospedeira ao *T. cruzi*.

A célula eucariótica é uma estrutura extremamente ordenada onde proteínas são codificadas no núcleo e sintetizadas no citoplasma. Todas as proteínas não citosólicas são transportadas para seu destino final, processo essencial para função da proteína. O conhecimento da localização celular de uma proteína é importante para o entendimento de sua função no metabolismo celular (43, 44). Por

isso, a localização subcelular da proteína RasGEF1b possibilitará um melhor entendimento da sua participação na resposta imune desencadeada por tGPI e outros agonistas de TLRs. Além disso, estudos sobre a função do RasGEF1b contribuirão para uma maior compreensão do papel dos RasGEFs na resposta imune celular das doenças parasitárias, incluído a Doença de Chagas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo geral a localização subcelular e caracterização funcional de RasGEF1b.

3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a localização subcelular da proteína RasGEF1b por análises de bioinformática.
- b) Determinar a localização subcelular da proteína FLAGRasGEF1b
- c) Estabelecimento de sistema de RNA de interferência para RasGEF1b.
- d) Caracterização funcional da proteína FLAGRasGEF1b quanto à atividade de troca de guaninas.
- e) Produção de soro policlonal dirigido contra His6-RasGEF1b.

4. Materiais e Métodos

4.1 Análise da proteína RasGEF1b utilizando ferramentas de bioinformática

A análise da localização subcelular foi utilizando os programas pTarget (bioinformatics.albany.edu/~ptarget/), NucPred (www.sbc.su.se/~maccallr/Nucpred/), DbSubLoc (www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/DbSubloc.html), Psort (http://www.Psort.org/) e MultiLoc (www.bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/).

4.2 Cultivo celular

As células embrionárias renais humanas (HEK 293T) foram gentilmente cedidas pelo Instituto Pasteur (Paris, França), e as células de ovário de hamster chinês (CHO) foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria de Fátima Leite (ICB-UFMG). As células foram crescidas em garrafas de cultura em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*- Sigma), acrescidos de 10% soro fetal bovino (Gibco) e 100 unidades/ml de penicilina/streptomicina em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂.

4.3 Transfecção das células HEK 293T com o FLAG*RasGEF1b*.

A transfecção foi feita pelo método de fosfato de cálcio, com 2µg do plasmídeo pFLAGCMV2 (Sigma) (Figura 4) contendo a região codificadora do gene *rasGEF1b*, o qual foi clonado e gentilmente cedido pelo Dr. Aristóbolo Mendes da Silva (ICB-UFMG). Como controle de transfecção, foi utilizado 2µg do vetor vazio. A passagem das células foi realizada em placas de 10cm de diâmetro, de forma que no dia da transfecção, a confluência era de aproximadamente 70%. Para a transfecção, o meio de cultivo foi trocado e, após 2 h, o complexo de DNA foi adicionado a cada placa, e estas foram incubadas em estufa a 37°C, por 16h. O complexo é formado adicionando-se CaCl₂ 2M ao DNA a ser transfectado e, a essa mistura, HeBs 2X (0,28M NaCl; 0,05M HEPES; 1,5mM NaH₂PO₄). O meio foi retirado e as placas lavadas 2 vezes com PBS 1X (0,2 M NaCl; 0,002M KCl; 0,003M Na₂HPO₄; 0,0018M KH₂PO₄). Às placas foi adicionado o meio de cultivo apropriado seguido de incubação em estufa CO₂ por 24h.

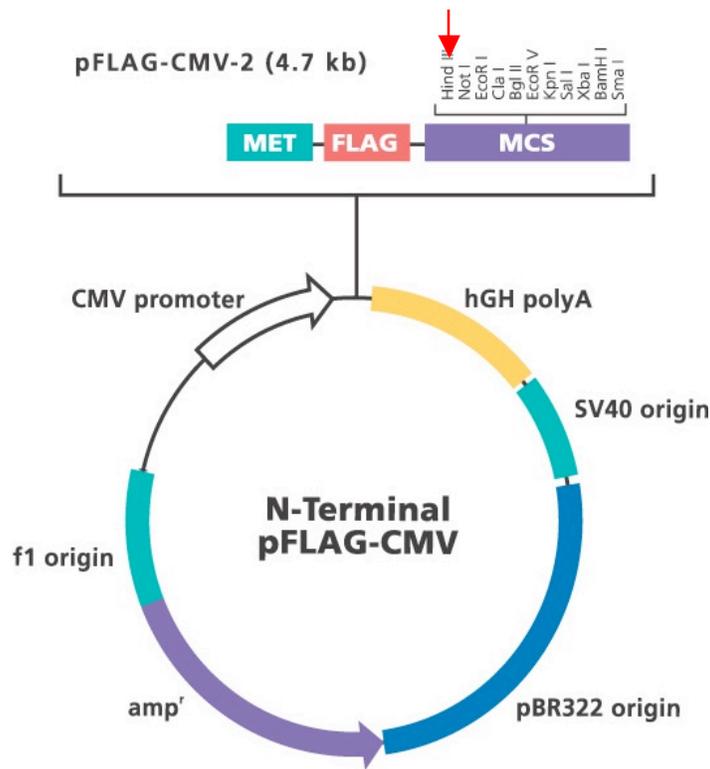


Figura 4. Representação esquemática do vetor de clonagem pFLAG-CMV2. A seta indica o sítio de restrição da enzima *Hind* III presente no sítio múltiplo de clonagem do vetor. Esse sítio está também presente nos iniciadores utilizados para a clonagem do *rasGEF1b* no pFLAG-CMV2. MCS - Sítio múltiplo de clonagem. CMV promoter - Promotor do citomegalovírus. SV40 origin - Origem de replicação eucariótica. f1 origin - Origem de replicação do fago f1. Amp – Gene de resistência a ampicilina. pBR322 origin – Origem de replicação procariótica.

4.4 Fracionamento subcelular

Para o fracionamento subcelular, as células HEK 293T foram lavadas em PBS 1X pH 7.2 gelado e ressuspensas em 1mL de tampão de homogeneização (20mM Hepes-KOH, pH 7.5; 10mM KCl; 1,5mM MgCl₂; 1mM Na-EDTA; 1mM DTT; 250mM sacarose; 0,1mM PMSF e 8µg/mL de aprotinina). Após incubação no gelo por 10 min, as células foram homogeneizadas por 20 passagens através de uma seringa de insulina de 1mL e centrifugadas a 700 x g, por 10 min, à 4°C, para remover núcleos e debris celulares. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 10000 x g, por 25 min, a 4°C. O sedimento resultante foi utilizado como fração de membranas pesadas (membrana plasmática, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomos e endossomos tardios). O

sobrenadante foi coletado e centrifugado a 100000 x g, por 60 min, a 4°C, para originar as frações de membranas leves (vesícula endocíticas e peroxissomos), no sedimento, e o citosol no sobrenadante. Os sedimentos foram então ressuspensos em tampão de homogeneização e levados a mesma concentração de proteínas do citoplasma.

4.5 *Western blotting* das frações subcelulares

Para identificar cada fração subcelular e em qual(s) estava(m) a proteína FLAGRasGEF1b, foi feito *Western Blotting* utilizando anticorpos dirigidos contra proteínas específicas de cada fração e contra o peptídeo FLAG. Primeiramente, as amostras foram fracionadas em SDS-PAGE 12% e em seguida transferidas para uma membrana de PVDF por 1h a 250mA no gelo. Posteriormente a membrana foi incubada em solução de bloqueio (PBS1x 0,01M de NaHPO₄, 0,15M de NaCl, pH 7,2, 5% de leite em pó desnatado, 0,1% Tween®20), por 1h sob agitação à temperatura ambiente. Os anticorpos utilizados foram diluídos na mesma solução. Para identificação das frações, foram utilizados os anticorpos anti-histona 4 (1:2000) (Santa Cruz) para a fração nuclear, anticorpo anti-calreticulina (1:1000) (Abcam) para fração de membranas pesadas, anticorpo anti-rab 4, (1:200) (Santa Cruz) para a fração de membranas leves e para o citosol anticorpo anti-actina (1:3000) (Santa Cruz). Foi utilizado o anti-FLAG (FLAG, *Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys*) (Sigma), na diluição de 1:6000, para a localização subcelular da proteína RasGEF1b expressa em fusão com o peptídeo FLAG. O anticorpo secundário conjugados com peroxidase, anti-coelho (Promega) na diluição de 1:5000, foi utilizado para a revelação dos anticorpos anti-histona, anti-calreticulina e anti-Rab4, e secundário anti-camundongo (Promega) na diluição de 1:2000 foi utilizado para a revelação dos anticorpos anti-actina e anti-FLAG. Os anticorpos secundários foram incubados por 1h sob agitação a temperatura ambiente. Entre os anticorpos primários e secundários, a membrana foi lavada por 10 min por três vezes com PBS1x pH 7,2 com 0,1% Tween®20. A revelação foi feita em câmara escura utilizando reagente para quimioluminescência “ECL plus *Western Blotting* Detection System” (Amersham Biosciences) e revelado em filme Raio-X (Kodak).

4.6 Amplificação da região codificadora do DNA de FLAG*RasGEF1b*

Para a reação em cadeia pela Polimerase (PCR) foi utilizado o vetor pFLAGCMV2-RasGEF1b como molde nas concentrações de 1 e 5 ng/ μ L. Nesta reação, foram utilizadas 0,5 μ L de uma mistura das enzimas Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e TLI DNA polimerase (Promega) em uma proporção de 4:1, e uma mistura contendo, nas concentrações finais: 2 μ L dNTPs (2mM dATP, 2mM dCTP, 2mM dGTP, 2mM dTTP), 2 μ L de Tampão Taq 10X (Invitrogen), 1 μ L do iniciador RasGEF1b direto 5'-TACAAGCTTTTGATCTACCATGGACTAC-3' (iniciador *HindIII*), 1 μ L do iniciador RasGEF1b reverso 5'-TACGAATTCAACTCTGCCCAAAGGCTGGA-3' (iniciador *EcoRI*), 12,5 μ L de H₂O livre de nucleases. O volume final da reação foi de 20 μ L. A reação ocorreu por 35 ciclos de 94°C/1 min, 55°C/1 min, 74°C/2 min e um último ciclo de extensão a 74°C/15 min. As amostras foram diluídas em tampão 6x de amostra para DNA (Tampão 6X 0,25% azul de bromofenol, 0,25% etilenoglicol, 30% de glicerol em H₂O), e os produtos de amplificação foram fracionados em gel de agarose a 1% em TAE1x (0,04 M Tris-acetato, 0,001M EDTA) contendo (0,5 μ g/mL) de brometo de etídio. Os DNAs fracionados no gel foram visualizados transiluminados-UV (ultra violeta)

4.7 Clonagem no vetor pCR® 2.1 TOPO.

Para a clonagem do DNA amplificado no vetor pCR2.1 TOPO, foram retirados 4 μ L da reação de PCR e adicionado 1 μ L de solução salina (1,2M NaCl; 0,06M MgCl₂) e 1 μ L do vetor pCR® 2.1 TOPO. Esses reagentes foram incubados a 22°C por 30 min. A transformação bacteriana foi feita adicionando os 6 μ L da ligação do pCR® 2.1 TOPO com o DNA FLAG*RasGEF1b* e 50 μ L de células bacterianas XL1-Blue (*E. coli*) quimicamente competentes. A mistura foi incubada no gelo durante 30 min. Posteriormente foi feito choque térmico pela incubação por 1 min a 42°C, seguido pela incubação em gelo por 1 minuto. As bactérias foram crescidas, sob agitação, a 37°C por 1 h em meio LB (1% NaCl, 1% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, pH 7.2) sem antibiótico. Alíquotas da suspensão bacteriana foram plaqueadas em meio LB ágar (meio sólido) contendo 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 horas.

Para análise da clonagem foram selecionados clones aleatórios e procedeu-se à preparação do DNA plasmidial. Os plasmídios obtidos foram submetidos à análise de restrição. As digestões enzimáticas de 5µL do produto de extração plasmidial foram feitas com a enzima *BamH* I (Promega). Foram utilizados, para cada reação, 1 µL da enzima, tampão 10X específico para a enzima segundo catálogo do fabricante, BSA 100x e H₂O Milli-Q autoclavada suficientes para reações de 20 µL. As misturas foram incubadas a 37°C por 1 h e 30 min e fracionadas em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio. O gel foi observado em luz U.V.

4.8 Preparação de DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial de sete colônias foi realizada utilizando o “Kit QIAprep Miniprep” (Qiagen). Cada colônia foi cultivada em 4mL de LB contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37°C, sob agitação, por 18 h. As culturas bacterianas foram centrifugadas a 10000 *x g* por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos obtidos foram solubilizados em 300µL do tampão de ressuspensão P1 (50mM Tris-HCl pH 8,0; 10mM EDTA; 100µL/mL RNase A). À mistura foram adicionados 300µL de tampão de lise P2 (200 mM de NaOH; 1% SDS (p/v)) por tubo e feita a inversão dos mesmos cerca de 6 vezes. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foi adicionado tampão de neutralização N3 (3M acetato de potássio pH 5,5) gelado, 300 µL por tubo, seguido de incubação no gelo por 5 min. Os conteúdos foram centrifugados a 14000 *x g* por 1 min. As colunas foram equilibradas com 1mL do tampão QBT (750mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanol (v/v); 0,15% Triton X-100(v/v)) cada. Os sobrenadantes foram aplicados nas colunas. As colunas foram lavadas 4 vezes com 1mL do tampão de lavagem QC (1M NaCl; 50mM MOPS pH 7,0; 15% isopropanol (v/v)). Os tubos coletores foram descartados e substituídos por tubos de microcentrifuga. Os fragmentos de DNA foram eluídos com 800µL de tampão de eluição QF (1,25M NaCl; 50mM Tris.Cl pH 8,5; 15% isopropanol (v/v)) e sedimentados com 560 µL de isopropanol à temperatura ambiente. Após centrifugação a 14000 *x g* por 5 min, os sobrenadantes foram removidos e aos sedimentos foram adicionados 700µL de etanol 70%, seguindo a mesma centrifugação anterior. Os sobrenadantes foram removidos e os sedimentos secaram em temperatura ambiente por 10 min e foram dissolvidos em 50µL de H₂O livre de nucleases.

4.9 Clonagem nos vetores de expressão eucariótica pcDNA3-YFP e pcDNA3-mRFP

Para a ligação do DNA correspondente à FLAG*RasGEF1b*, obtido como descrito no item anterior, nos vetores selecionados para produção da proteína em fusão a proteínas fluorescentes, procedeu-se à digestão enzimática de 20µL do plasmídeo pCR® 2.1 TOPO FLAG*RasGEF1b* utilizando 2µL das enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* 0,3 µL de BSA 100x, 3µL de tampão E 10X e 2,7µL de H₂O estéril. A reação foi incubada a 37°C por 2 h e o resultado verificado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e observado em luz U.V. O fragmento digerido foi excisado do gel com o auxílio de um bisturi, pesado e purificado com QIAEX® II Gel Extraction Kit segundo protocolo do fabricante. Vinte microlitros dos vetores pcDNA3-YFP e pcDNA3-mRFP, gentilmente cedidos pelo Dr. Douglas Golenbock (UMass, USA), foram digeridos utilizando 2µL das enzimas *HindIII* e *EcoRI* e os outros reagentes necessários para uma reação cujo volume final foi de 30µL. A reação foi incubada a 37°C por 2 h e o fragmento digerido foi excisado do gel e purificado com o Kit citado anteriormente. O inserto e os vetores foram quantificados e utilizados para a reação de ligação 2µL dos vetores e 6µL do inserto do DNA do *flagrasgef1b*, ambos digeridos com *HindIII* e *EcoRI*, dando uma proporção de 6:1 (inserto:vetor). Dois microlitros de T4 DNA ligase (Invitrogen) e 5µL de tampão 5X (Invitrogen) foram adicionados a cada reação com um volume final de 25µL. A reação foi realizada a 23°C por 16 h.

Os produtos das ligações foram transformados em bactérias XL1-Blue quimicamente competentes de acordo com os protocolos de transformação descritos anteriormente. Colônias resultantes foram selecionadas aleatoriamente para diagnóstico por digestão da presença do plasmídeo contendo FLAG*RasGEF1b*. A extração do DNA plasmidial das 10 colônias foi realizada utilizando o “Kit QIAprep Miniprep” (Qiagen), de acordo com o protocolo citado anteriormente. A digestão foi realizada com 10µL de cada construção, 1µL de cada enzima, *HindIII* e *EcoRI*, BSA 100x, tampão indicado pelo fabricante e H₂O estéril para um volume final de 20µL. Os produtos das digestões foram fracionados em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio para análise em luz UV.

4.10 Experimentos de microscopia confocal

Para os experimentos de localização subcelular da proteína FLAGRasGEF1b, foram utilizadas células HEK 293T e CHO transfectadas ou não com os plasmídios de interesse. As células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer-Improved Neubauer, 1X10mm de profundidade (Boeco), e transferidas para placas de 6 poços (35mm) para que no dia seguinte obtivéssemos uma confluência entre 60 e 80%. Uma hora antes da transfecção o meio das células era trocado por Opti-MEM (Invitrogen). Foram utilizados Lipofectamina 2000 (Invitrogen) para transfecção das células CHO e Eugene (Roche) para as células HEK 293T. O complexo reagente de transfecção/DNA também foi obtido na presença de meio Opti-MEM.

Para a transfecção das células HEK 293T, utilizamos 0,5µg/poço das construções FLAGRasGEF1b-mRFP e/ou FLAGRasGEF-YFP, enquanto para as células CHO foi utilizada a concentração de 2µg/poço, sendo que os reagentes de transfecção foram utilizados em uma concentração de 6:1 em relação à concentração de DNA. O reagente de transfecção foi diluído em 100µL de meio e incubado a T.A. por 10 min, e em seguida o DNA foi adicionado e vortexado por 10 segundos. O complexo foi incubado a T.A. por 30 min e em seguida distribuído uniformemente nos poços. Vinte e quatro horas após a transfecção as células foram transferidas para Lab-Tek® II Chamber Slide System e incubadas em estufa a 37° C 5% CO₂. As células HEK 293T foram fixadas com Metanol gelado por 2 min 24 horas após a transferência, enquanto as células CHO foram fixadas com paraformaldeído 4% também 24 h após a transferência.

Para os experimentos de imunofluorescência, as células eram lavadas 2 vezes por 10 min com PBS1x pH 7,2 e permeabilizadas com tampão de permeabilização (PBS1x, BSA 3% e Triton X-100 0,2%) por 30 min a T.A. Os anticorpos primários utilizados foram anti-LAMP1 (1:500 - Abcam), marcador de lisossomos e anti-EEA1 (1:500 - Abcam). Os anticorpos foram incubados a T.A. por 1 h, diluídos em tampão de permeabilização. Após duas lavagens de 10 min, as células foram incubadas com os anticorpos secundários Alexa Flúor 488 ou Alexa Flúor 633 (1:1000 - Molecular Probes) de acordo com o anticorpo primário utilizado: Alexa Fluor 488 para a transfecção com FLAGRasGEF1b-mRFP e Alexa Flúor 633 para FLAGRasGEF1b-YFP. Os anticorpos foram diluídos em tampão de permeabilização e incubados por 1h a T.A., ao abrigo da luz. Em seguida as células foram lavadas com PBS1x 3 vezes por 15 min e as lâminas montadas

com meio de montagem Vectashield (Vector laboratories) com ou sem DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma). Foram realizados experimentos controle nos quais não houve transfecção, transfecção com vetores que não continham o DNA de interesse, o uso ou não de anticorpos primários e/ou secundários. Em alguns experimentos que não se utilizou marcação por anticorpos, as lâminas eram montadas após fixação. Quando utilizados os marcadores ER-Tracker, para marcação do retículo endoplasmático e LysoTracker, para marcação de organelas ácidas, 48hrs após a transfecção o reagente foi adicionado às células vivas e após 30 min avaliado em microscópio confocal.

As imagens foram obtidas utilizando o microscópio confocal Zeiss LSM510 do Laboratório de Entomologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ). Para excitar as amostras foram utilizados os lasers de Argônio 488nm, Hélio-Neônio1 543nm e Hélio-Neônio2 633nm. A proteína FLAGRasGEF1b-mRFP é excitada pelo laser Hélio-Neônio1 a 590nm e emite a 615nm, a proteína FLAGRasGEF1b-YFP é excitada pelo laser Argônio a 488nm e emite a 514nm, o mesmo ocorrendo com a anticorpo secundário Alexa Flúor 488. Por outro lado, o anticorpo secundário Alexa Flúor 633 é excitado pelo laser Hélio-Neônio2 a 635nm e emite a 650nm. As imagens foram captadas para que a menor quantidade de ruído estivesse presente, e estas foram processadas com a auxílio do programa LSM Image Browser.

4.11 Experimentos de RNA de interferência

Células HEK 293T foram utilizadas para experimentos de inibição da expressão do RNAm codificante da proteína ectópica FLAGRasGEF1b-YFP. As células foram cultivadas em placas de 6 poços para que no dia da transfecção estivessem com uma confluência entre 80 e 90%. Uma hora antes da transfecção o meio das células foi trocado por Opti-MEM (Invitrogen). O complexo reagente de transfecção Fugene/DNA também foi preparado em meio Opti-MEM. Nas transfecções foram utilizados 0,5µg/poço da construção FLAGRasGEF-YFP e 3µL de Fugene para imunofluorescência e 0,5µg/poço da construção FLAGRasGEF-mRFP e 3µL de Fugene para FACS (citometria de fluxo). No experimento de inibição da expressão do mensageiro de FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b-mRFP as células foram co-transfectadas com os plasmídios correspondente às proteínas ectópicas e os plasmídios pLKO.1 (Openbiosystems – Figura 5) contendo DNAs correspondente aos shRNAs93 (5'-

CCGGGCCTGAACATTTGCTGCTAATCTCGAGATTAGCAGCAAATGTTCAGGCTTTTTG
 3') ou shRNA96 (5'-
 CCGGGCGTACGTAGAATGGTTTAATCTCGAGATTAAACCATTCTACGTACGCTTTTTG-
 3') especificamente designados para inibição de RasGEF1b de *M. musculus*, na proporção de 1:1 para os DNAs. Como controle negativo foi utilizado o mesmo vetor carreando o shRNA63 (5'-AAACCCAGGGCTGCCTTGGAAAAG-3') designado para a inibição da mensagem de RasGEF1b humano e cuja seqüência não parecia com RasGEF1b murino. Quarenta e oito horas após a transfecção, a expressão da proteína FLAGRasGEF1b-YFP foi analisada com o auxílio de um microscópio de fluorescência, e para citometria e fluxo, foram utilizadas células transfectadas com FLAGRasGEF1b-mRFP. Para a análise por citometria de fluxo, a células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer; 1×10^6 células foram fixadas em paraformaldeído 2% e ressuspensas em um volume final de 200 μ L de PBS e analisadas por FACScan. Foi feita a aquisição de 20000 eventos.

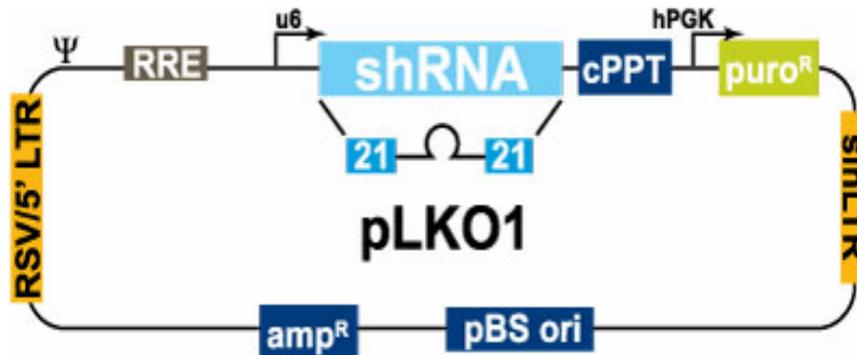


Figura 5. Representação simplificada do vetor pLKO.1 utilizado nos experimentos de RNAi. Estão representadas as principais características do vetor, incluindo o gene de resistência a puromicina para seleção em mamíferos (puro), promotor U6 e cDNA do shRNA. Adaptado da Open Biosystems (<http://www.openbiosystems.com/ProductLiterature>)

4.12 Ensaio de ativação de Ras pela proteína recombinante FLAGRasGEF1b

Células HEK 293T foram utilizadas para o ensaio de ativação de Ras. As células foram cultivadas em placas de 6 poços para que no dia da transfecção estivessem com uma confluência entre 80 e 90%. Uma hora antes da transfecção o meio das células foi trocado por Opti-MEM. O complexo reagente de transfecção Fugene/DNA também foi preparado em meio Opti-MEM. Nas transfecções foram utilizados 0,5 µg/poço da construção FLAGRasGEF1b e FLAGRasGEF1b-YFP e 3µL de Fugene, e como controle negativo foi utilizado o vetor sem o cDNA do *rasGEF1b* (pcDNA3YFP). O ensaio de ativação de Ras foi realizado 48h após a transfecção utilizando o kit *Ras activation* (Upstate), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente as células foram lavadas com PBS e adicionadas de 500µL do tampão MLB (Mg²⁺ Lysis/Wash Buffer com 10% glicerol e 10µg/ml de aprotinina e leupeptina) para a lise das células. Em seguida o lisado foi homogeneizado por 5 passagens através de uma seringa de insulina de 1mL e centrifugado a 14000 x g, durante 5 min, a 4°C. O sobrenadante (500 µL) foi removido e utilizado para o experimento. Para o teste da ativação de Ras, foram adicionados 10µL (10µg) de reagente de ensaio de Ras (Raf-1 RBD agarose) e incubado por 45 min a 4°C sob leve agitação. A reação foi centrifugada a 14000 x g por 20 segundos a 4°C para recuperação das “beads” de agarose. Estas foram lavadas 3 vezes com MLB e ressuspensas em 40µL de tampão Laemmli (62,5mM Tris-HCL, pH 6,8; SDS 2%; b-mercaptoetanol 5%; glicerol 20%; azul de bromofenol 0,5%) e 2µL de DTT e aquecido por 5 min a 90°C. Para os controles do experimento, aos extratos celulares de HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pcDNA3YFP, foram adicionados 10µL de EDTA 0,5M e em seguida 5µL de GTPγS 100x para controle positivo e 5µL de GDP100x para controle negativo. A reação foi incubada por 30 min a T.A. sob agitação e parada adicionando 32,5 µL de MgCl₂ 1M a 4°C. Posteriormente, estas preparações foram incubadas com Raf-1 RBD agarose como descrito anteriormente. Para a verificação da provável ativação de Ras foi feito *Western Blotting*. O protocolo utilizado foi o mesmo citado anteriormente, sendo que o anticorpo primário utilizado anti-Ras clone RAS10 (Upstate), fornecido no kit de ativação de Ras, na concentração de 1:5000 a 4°C por 18h; o anticorpo secundário utilizado foi anti-mouse conjugado com peroxidase (Santa Cruz) na concentração de 1:2000.

4.13 Expressão e purificação da proteína recombinante His6-RasGEF1b.

A região codificadora da proteína RasGEF1b foi clonada no vetor procariótico pQE-30 pela doutoranda Tatiana Nunes Silveira, e foi utilizado para transformação de bactérias e expressão da proteína recombinante His6-RasGEF1b. Uma colônia isolada das bactérias XL1-Blue (*Escherichia coli*) transformadas com a construção pQE-30 His6-RasGEF1b foi inoculada em 20 mL de meio LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. As bactérias foram crescidas sob agitação (130 rpm), a 37° C, durante 18 h. O pré-inóculo descrito anteriormente foi inoculado em 1 L de meio LB contendo o antibiótico apropriado, e este foi crescido a 37°C, sob agitação, até DO₆₀₀ de 0,6. As seguir as bactérias foram induzidas para expressão da proteína com 1mM de IPTG (isopropiltio-β-galactosidase). No momento em que o IPTG foi adicionado (0h), retirou-se 1,5mL do inoculo, que foi centrifugado a 10000 \times g por 2 min, sendo a amostra representativa do perfil de expressão de proteínas bacterianas antes da indução. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 30 µL de tampão Laemli. Após 4 e 6 horas de indução a 37°C, foi retirado 1,5 mL da cultura, agora representando o perfil de expressão de proteínas após a indução com IPTG (processadas como descrito anteriormente). O restante da cultura total induzida foi centrifugado a 5000 rpm e o “pellet” bacteriano foi congelado a -80°C em PBS e posteriormente adicionado 1 mg/ml de lisozima e sonicadas. Após a lise o extrato foi centrifugado a 13000 rpm durante 20 minutos, e sabendo que His6-RasGEF1b é uma proteína insolúvel, o “pellet” foi ressuspenso em 2 mL de uréia 8M. A fração insolúvel solubilizada em uréia foi resolvida em SDS-PAGE 12% (15 cm de comprimento) descrito a seguir; um faixa de aproximadamente 1 cm foi recortada do gel e corada com azul de coomassie para localização da banda correspondente à His6-RasGEF1b. Posteriormente, a faixa corada foi colocada ao lado do restante do gel não corado e a banda correspondente foi recortada do gel. A banda foi macerada em 1 mL de água e incubada durante 18h a 4°C para eluição da proteína recombinante. Foi realizada uma segunda eluição, no mesmo volume. Os eluatos foram reunidos, quantificados e resolvidos em SDS-PAGE para verificação da purificação de His6-RasGEF1b, que foi utilizada para imunização de coelhos.

4.14 SDS-PAGE

Os géis foram feitos a partir de uma solução estoque (p/v) de acrilamida 29,2 % e bis-acrilamida 0,8 % diluída para uma concentração final de 12 % em Tris-HCl 375 mM, pH 8,8 e SDS 0,1 % (p/v) para preparação do gel de separação e, diluída a 4 % em Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v) para preparação do gel de aplicação e concentração das amostras. A polimerização dos géis de concentração e separação ocorreu na presença de persulfato de amônio e TEMED (Sigma-Aldrich, Inc.) nas concentrações finais de 0,1 % e 1:2000 (v/v) respectivamente. As amostras de proteínas foram desnaturadas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo SDS 2 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,0005 %, β -mercaptoetanol 2,5 %), homogeneizadas em “vortex” e fervidas por 5 min a 90 – 100° C. A eletroforese foi realizada a 200 V por cerca de 45 min, em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1 %). O gel foi corado com azul de coomassie (Coomassie blue R 250 0,25 %, metanol 50 %, ácido acético 10 %) por 2 horas a temperatura ambiente e lavado várias vezes com solução descorante total (metanol 30 %, ácido acético 10%). A massa molecular da proteína foi comparada com padrão de peso molecular de proteínas Bench Mark TM Protein Ladder (Invitrogen).

4.15 Produção de soro imune de coelho dirigido contra His6-RasGEF1b

Para imunização foram utilizados 2 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) para os experimentos de imunização. O coelho 1 foi utilizado como controle e foi imunizado apenas com adjuvante de Freund, e o coelho 2 foi imunizado com 300 μ g da proteína His6-RasGEF1b em cada imunização, juntamente com a quantidade de adjuvante de Freund citada anteriormente. Na primeira imunização foi utilizado adjuvante de Freund completo (Sigma), e nas três posteriores foi utilizado adjuvante incompleto. A imunização foi feita através de injeções intradérmicas em 5 sítios, no dorso dos coelhos, com um intervalo de 21 dias entre cada imunização. Foi coletado 5 ml de sangue dos coelhos antes da primeira imunização (soro pré-imune), e 8 dias após a quarta imunização os animais foram sangrados por punção cardíaca (soro hiper-imune).

Após a retirada do sangue dos coelhos, este foi colocado em tubos de 50 ml, incubados a 37° C durante 15 minutos, seguida de incubação a 4° C durante 18 horas. O soro obtido foi centrifugado a 6000 rpm a 4°C por 15 minutos, aliquoteado e estocado a -80°C.

4.16 ELISA e *Western Blotting* com soro dos coelhos

Inicialmente uma placa foi sensibilizada com 100µL de proteína His6-RasGEF1b/ poço a 20µg/ml em tampão carbonato (15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH 9,6). A placa foi incubada por 16h a 4°C. O volume foi desprezado por inversão das placas e em seguida adicionado 200µL de tampão de bloqueio (PBS, 2% leite em pó desnatado) e incubado por 2h a 37°C. Em seguida, o soro dos coelhos foi diluído em tampão de incubação (PBS1x, 2% leite em pó desnatado, 0,05% Tween®20) em diluição seriada variando de 1:40 à 1:1280, em triplicata. Nos poços da placa foram adicionados sucessivamente 100µL dos soros dos coelhos antes da primeira, e após a terceira e quarta imunização, nas diferentes concentrações. Foi feita uma incubação por 1h e 30 min a 37°C e em seguida lavado três vezes com tampão de lavagem (0,23M NaCl, 0,05% Tween®20). O anticorpo secundário foi diluído em tampão de incubação numa concentração de 1:2500. Foi utilizado o anticorpo anti-IgG de coelho (Promega) conjugado a peroxidase (HRP). A incubação foi feita com 100µL em cada poço, inclusive no controle negativo por 1h a 37°C, e em seguida lavado seis vezes com tampão de lavagem. A revelação foi feita com 10 mL de tampão citrato-fosfato (0.05M Na₃C₆H₅O₇ . 2H₂O; 0.05M Na₂H₂PO₄ .H₂O) contendo 100µL de TMB e 30µL de H₂O₂ 40 v. A reação foi parada com H₂SO₄ (1:20) e a leitura foi feita a 450nm em espectrofotômetro.

Para testes preliminares foi utilizado soro hiper imune de coelho coletado após a 3 dose. Para tal, 20ng de His6-RasGEF1b e 20 µg de extrato de células HEK 293T transfectadas com FLAGRasGEF1B foram resolvidas em SDS-PAGE, transferidas pra membrana de PVDF (Hybond-P – GE Healthcare) e submetidas ao *Western blotting*. Membranas distintas contendo as mesmas amostras foram incubadas com soro pré-imune de coelho e soro da 3ª dose anti-His6-RasGEF1b 1:100 em PBS1x durante 2h a TA, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween (0,1%) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (Promega) 1:2000 conjugado à peroxidase (HRP) em PBS-leite 3% durante 1 hora a TA, a seguir, a membrana foi lavada novamente com PBS-Tween e reveladas com reagente de quimioluminescência ECL plus (GE Healthcare).

5. Resultados

5.1. Análise da proteína RasGEF1b utilizando ferramentas de bioinformática

A utilização de programas de bioinformática que fazem predições *in silico* sobre uma dada seqüência fornecida é ideal para obter informações, mesmo que hipotéticas, sobre proteínas ainda não caracterizadas. A partir da seqüência de aminoácidos de uma proteína, podem-se fazer predições à cerca de modificações pós-traducionais na seqüência protéica, estruturas secundária e terciária, localização subcelular, presença de domínios conservados e até mesmo interação com outras proteínas. Os resultados gerados direcionam o trabalho experimental e fornecem subsídios para responder perguntas biológicas pertinentes à proteína analisada. Uma vez que a proteína RasGEF1b está em processo de caracterização, foi feita uma análise preliminar utilizando ferramentas de bioinformática para avaliação da sua localização subcelular.

Segundo o Prosite, a proteína RasGEF1b possui um domínio RasGEFN na porção amino terminal (N-terminal), entre os aminoácidos 34 a 161, e um domínio catalítico, de troca de nucleotídeos guanina (RasGEF), situado entre os aminoácidos 205 a 453. A assinatura de domínio de fatores de troca de nucleotídeos guanina da proteína Ras está situada no domínio catalítico, entre os aminoácidos 371 a 401. O domínio RasGEFN contém um zíper de leucina codificado pelos aminoácidos 72-93 (LFMHPYELMAKVCHLCVEHQRL), e o domínio RasGEF contém três motivos de localização nuclear PVKKKHR, PVSRLKK, e PFERDRK codificados pelos aminoácidos 276 a 282, 316 a 322 e 421 a 427, respectivamente. Além disso, o programa detectou um sinal de direcionamento para microcorpúsculos entre os aminoácidos 471 a 473 (Figura 6). Foi verificado que a seqüência da proteína RasGEF1b humana apresenta alta similaridade com a proteína murina. As únicas diferenças são substituições conservadas de 12 aminoácidos, com 97,6% de identidade (15).

O programa pTarget fornece predições de localização subcelular de uma seqüência protéica. Para a proteína RasGEF1b a predição de localização é de 81,4% no citoplasma celular. O programa MultiLoc fornece predições de localização celular para 9 compartimentos, sendo que a predição para localização da RasGEF1b é de 92% citoplasmática. O programa DBsubloc (Database of Protein Subcellular Localization) prediz localização subcelular para seqüências eucariotas. Segundo este programa, a localização da RasGEF1b é nuclear, com 74% de exatidão. O programa

Psort também atribuiu o maior score (0,6) para localização nuclear. Entretanto, estes resultados são contrapostos pela predição fornecida pelo programa NucPred, cujo score para a RasGEF1b é 0,64. Neste programa, somente seqüências com “score” acima ou igual a 0,8 são preditas para terem localização subcelular nuclear, com 93% de exatidão. Algumas dessas predições de localização contrastam com o resultado que demonstra três motivos de localização nuclear para a proteína RasGEF1b, os quais são fortes indícios para sua real localização.

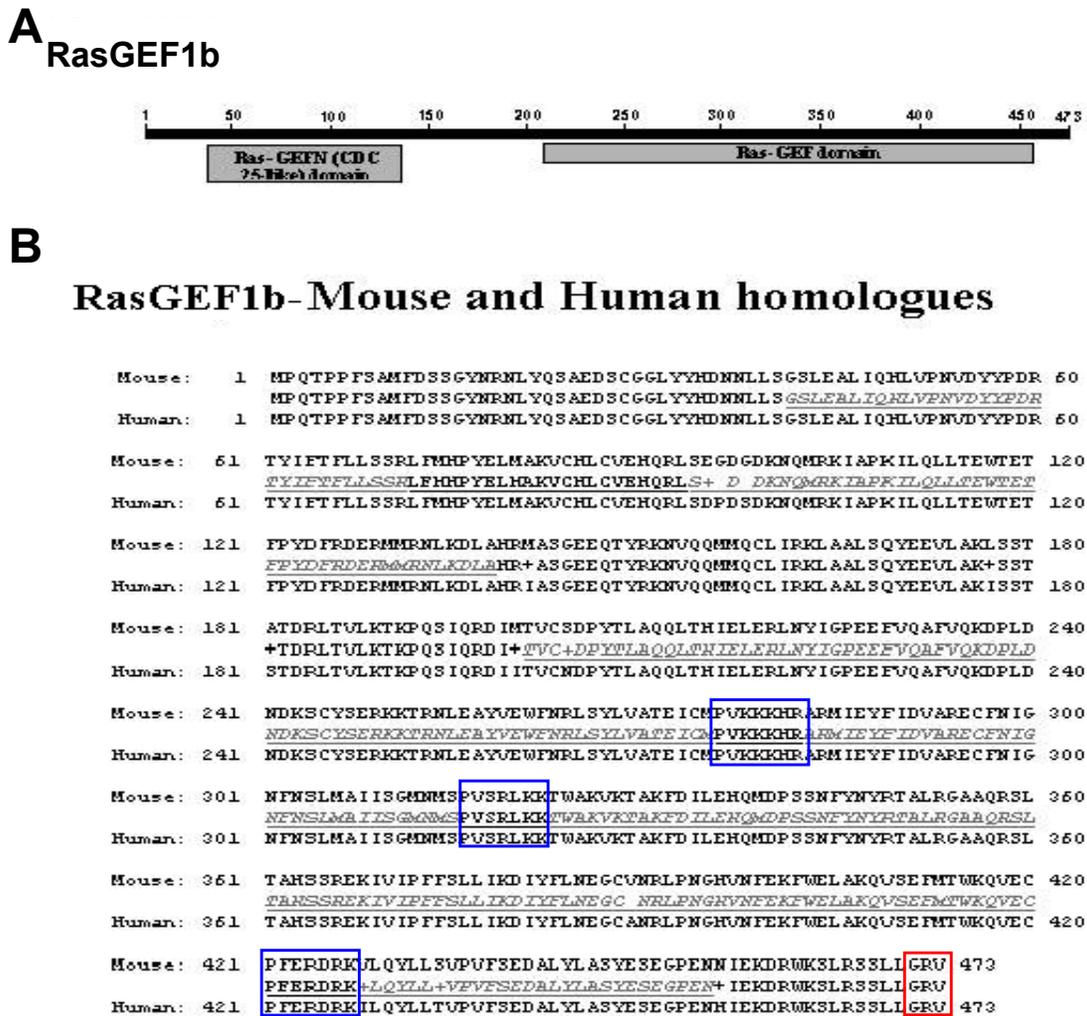


Figura 6. Análise comparativa de homologia entre as proteínas hipotéticas humana e murina codificadas pelo gene *rasGEF1b*. A - Esquema da localização dos domínios Ras-GEFN (domínio CDC25-like) e Ras-GEF presente nos homólogos humano e murino. B - Alinhamento de aminoácidos da proteína hipotética RasGEF1b murina e humana. Os domínios Ras-GEFN e RasGEF estão em cinza, itálico e sublinhados. O zíper de leucina presente no domínio RasGEFN está negrito sublinhado. Há três motivos de localização nuclear no domínio RasGEF: PVKKHR, PVSRLKK e PFERDRK, codificados pelos aminoácidos 276-282, 316-322 e 421-427, respectivamente, os quais estão no interior da caixa azul. Os aminoácidos GRV dentro da caixa vermelha indicam direcionamento para microcorpúsculos (15 modificada).

5.2. Localização subcelular da proteína FLAG-RasGEF1b em sistema eucarioto através de centrifugação diferencial e *Western Blotting*

Após a transfecção, as células HEK293T foram lisadas com tampão de lise (10mM KCl) e em seguida centrifugadas diferencialmente para obtenção das diferentes frações subcelulares. Através da técnica de *Western Blotting*, as frações foram marcadas com anticorpos contra proteínas específicas de cada fração. Utilizando anticorpo monoclonal anti-FLAG, foi demonstrado que a proteína FLAGRasGEF1b está presente principalmente nas frações de núcleo e membranas pesadas, como indicado pela forte reatividade com anti-histona e anti-calreticulina, respectivamente (Figura 7). Mas também pode se perceber a presença de pequenas quantidades da proteína na fração de membranas leves, como evidenciado pelo anticorpo anti-Rab4.

Dois principais problemas têm impedido o desenvolvimento de procedimentos rápidos e padronizados para fracionamento subcelular. Primeiro diferentes compartimentos celulares compartilham propriedades físicas similares e co-fracionam pelo menos em alguma extensão em gradientes convencionais. Segundo, as culturas de tecidos são mais comumente utilizadas para o fracionamento, porque as células podem ser manipuladas de uma maneira impossível de ser realizada em tecidos derivados de animais. Entretanto, depois da homogeneização, as culturas de células de tecidos são mais difíceis de fracionar do que a maioria dos tecidos, presumidamente devido às diferenças na organização do citoesqueleto. A completa purificação é, com poucas exceções, dificilmente possível (45). Isso explicaria, portanto, a possível contaminação entre frações, ou seja, a presença de certas proteínas em mais de uma fração subcelular.

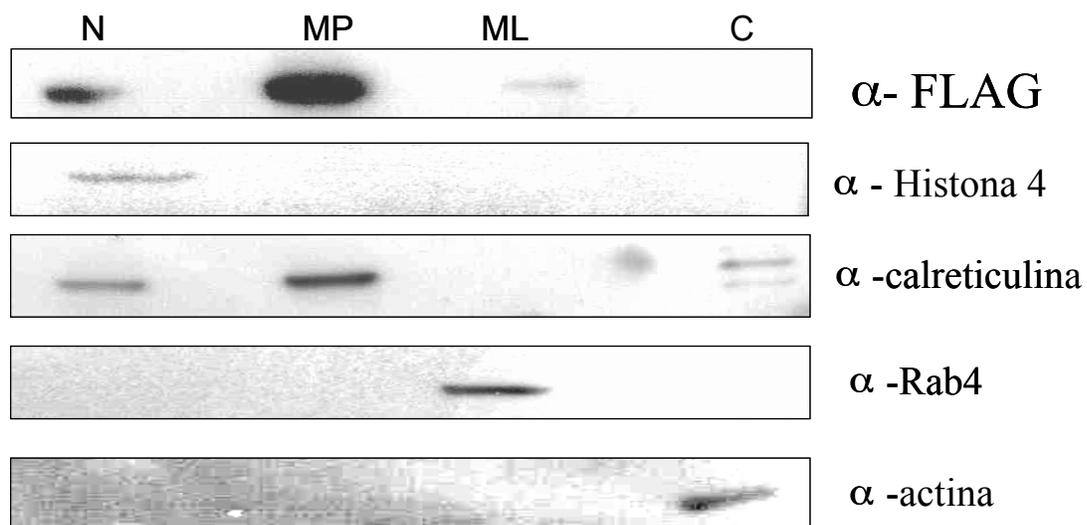


Figura 7. Análise por *Western Blotting* das frações subcelulares de células HEK293T expressando **FLAGRasGEF1b**. N (núcleo); MP (membranas pesadas); ML (membranas leves); (C) citosol. Os anticorpos utilizados para caracterização de cada fração estão indicados à direita. A revelação com anti-FLAG mostrou a localização da proteína FLAGRasGEF1b principalmente nas frações de membranas pesadas e no núcleo.

5.3 Amplificação da região codificadora do DNA *FLAGRasGEF1b* a partir da construção *pFLAGCMV2RasGEF1b*

Com objetivo de subclonar e expressar o gene *FLAGRasGEF1b*, utilizou-se a PCR para amplificação do DNA correspondente à região codificadora, gerando um produto de 1470 pb. Para tal finalidade foi utilizado na reação um mix contendo Taq Platinum e TLI DNA polimerase que possui atividade exonucleásica 3`-5` necessária para uma reação de alta fidelidade para expressão protéica (46). Como molde foi utilizado a construção *pFLAGRasGEF1b* nas concentrações de 1 e 5ng. Como demonstrado na Figura 8 houve amplificação de uma banda única com tamanho esperado.

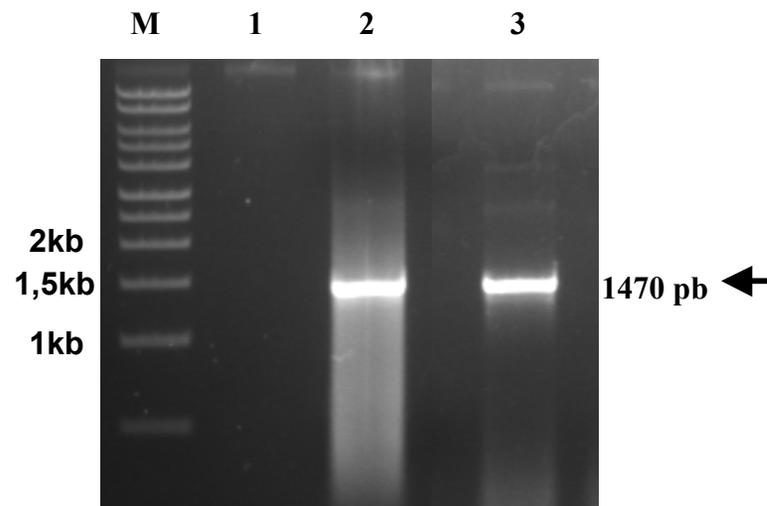


Figura 8. Amplificação por PCR da região codificadora de *FLAGRasGEF1b*, (seta) utilizando como molde o vetor *pFLAGCMV2RasGEF1b*. M - Marcador de DNA 1kb 1 - Controle negativo sem DNA; 2 - 5ng de DNA; 3 - 1ng de DNA do vetor *FLAGRasGEF1b*. A seta indica a banda correspondente ao *FLAGRasGEF1b*.

5.4 Perfil de restrição do DNA de FLAG*RasGEF1b* clonado no vetor TOPO 2.1

Após a amplificação do DNA de FLAG*RasGEF1b*, seu DNA foi clonado no vetor 2.1 TOPO para amplificação do inserto. Após a ligação do inserto ao vetor, bactérias XL1 Blue foram transformadas e crescidas em meio LB para posterior extração do DNA plasmidial. Para verificar a presença do DNA do FLAG*RasGEF1b* clonado, foram feitas digestões enzimáticas dos plasmídios extraídos de sete colônias com a enzima de restrição *Bam*HI, que possui um sítio de restrição no vetor na posição 252 e dois no DNA nas posições 728 e 1037. Os fragmentos gerados pela enzima de restrição estão representados na Figura 9. A digestão dos plasmídios obtidos das sete colônias podem gerar dois padrões de digestão de acordo com a posição em que o DNA foi inserido, sendo que quando a inserção ocorre na posição direta, formam-se fragmentos de 309 e 783pb e quando inserido na posição invertida formam-se fragmentos de 309 e 445pb. Como visto na figura 9, todas as colônias analisadas foram positivas para o DNA do FLAG*RasGEF1b*.

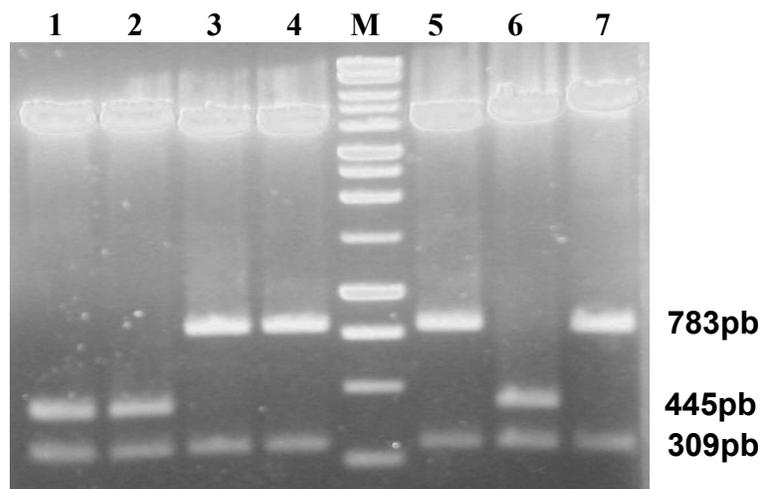


Figura 9. Perfil de restrição enzimática de FLAG*RasGEF1b* clonado no vetor pCR 2.1 TOPO. As digestões feitas com a enzima *Bam*HI confirmaram a inserção do DNA nas sete colônias, como visto pelo perfil de restrição esperado. M - Marcador de DNA 1kb; 1 a 7 – Clones de bactérias transformadas com o vetor 2.1 TopoFLAG*RasGEF1b*.

5.5 Clonagem nos vetores de expressão eucariótica pcDNA3-YFP e pcDNA3-mRFP

Os vetores pcDNA3-YFP e pcDNA3-mRFP foram escolhidos para a clonagem do DNA *FLAGRasGEF1b* por permitir a expressão da proteína recombinante em células de mamíferos, para análise por microscopia confocal, e por ser de fácil seleção (47 - 49). Os iniciadores utilizados na amplificação da região codificadora do *FLAGRasGEF1b* para a clonagem nos vetores contém sítios para as enzimas de restrição *Hind*III (TACAAGCTTTTGATCTACCATGGACTAC) e *Eco*RI (TACGAATTCAACTCTGCCCAAAGGCTGGA). O DNA plasmidial extraído do clone 4 (Figura 9) e dos plasmídios, foram digeridos com as enzimas selecionadas citadas acima, possibilitando a formação de extremidades coesivas para a ligação entre o inserto e o vetor. Após a ligação, foi feita a transformação de bactérias competentes. Deste experimento, foram escolhidas aleatoriamente cinco colônias de cada construção para teste por digestão enzimática. A Figura 10 mostra que todas as 10 colônias, cinco de cada construção, foram positivas para *FLAGRasGEF1b*-YFP e para *FLAGRasGEF1b*-mRFP.

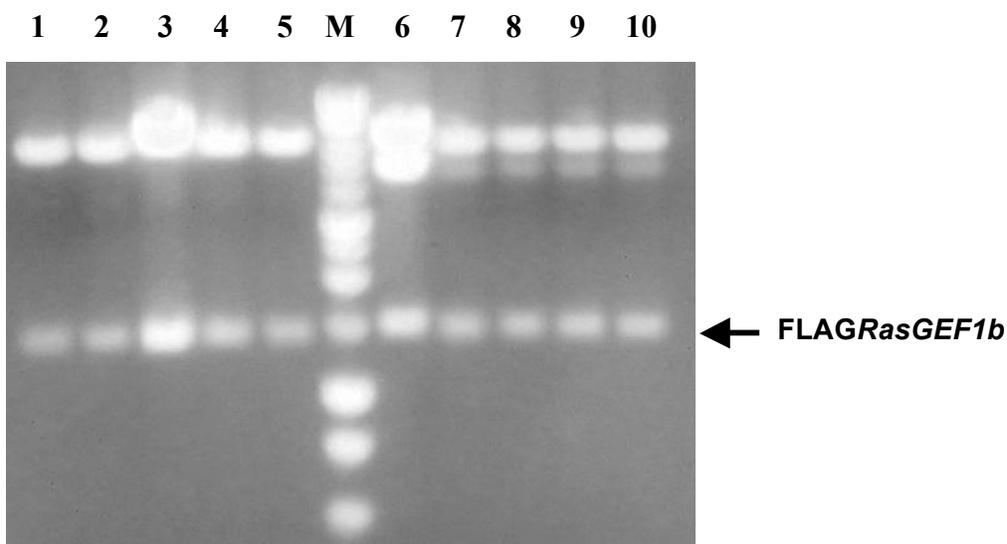


Figura 10. Perfil de restrição enzimática de *FLAGRasGEF1b* clonado nos vetores pcDNA3-YFP e pcDNA3-mRFP. As digestões feitas com as enzimas *Hind*III e *Eco*RI confirmaram a inserção do cDNA *flagrasGEF1b*, como visto pela banda indicada pela seta. M – Marcador de DNA 1kb; 1 a 5 – Clones de bactérias transformadas com a construção *FLAGRasGEF1b*-YFP; 6 a 10 – Clones de bactérias transformadas com a construção *FLAGRasGEF1b*-mRFP.

5.6 Análise da expressão e localização subcelular da proteína recombinante FLAGRasGEF1b fusionada a YFP e mRFP através de microscopia confocal

Para as análises de expressão e localização subcelular da proteína FLAGRasGEF1b foram utilizadas células HEK 293T e CHO. Essas linhagens celulares foram escolhidas por serem de fácil transfecção e por serem comumente utilizadas em experimentos de microscopia confocal (50, 51). O uso de construções expressando proteínas fluorescentes em fusão com uma determinada proteína de estudo tem se tornado uma técnica muito comum (49, 52). Células HEK 293T transfectadas com FLAGRasGEF1b-YFP e/ou FLAGRasGEF1b-mRFP foram utilizadas para análise da expressão das proteínas recombinantes e localização subcelular através de microscopia confocal. Como visto nas Figuras 11A e B, observamos que células HEK 293T expressam e mostram uma localização das proteínas FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b-mRFP citoplasmática e fora do núcleo. A Figura 11C mostra que as duas proteínas fluorescentes co-localizam e mais uma vez não estão presentes no núcleo, o que contradiz alguns dados de bioinformática sobre a predição da localização subcelular da proteína RasGEF1b. Apesar desta proteína possuir 3 sítios de direcionamento nuclear, estes não são suficientes para sua translocação para o núcleo.

Como controles experimentais, células HEK 293T transfectadas ou não com os plasmídios vazios expressando apenas YFP e mRFP, foram analisadas por microscopia confocal. Como observado na Figura 12A e B, nas células transfectadas com os plasmídios apenas expressando YFP e mRFP, essas proteínas localizaram-se em todo interior celular, incluindo o núcleo, pois proteínas menores que 40kda como GFP, YFP e mRFP, podem atravessar facilmente o poro nuclear (53). As células não transfectadas não possuem autofluorescência, como mostrado na Figura 12C.

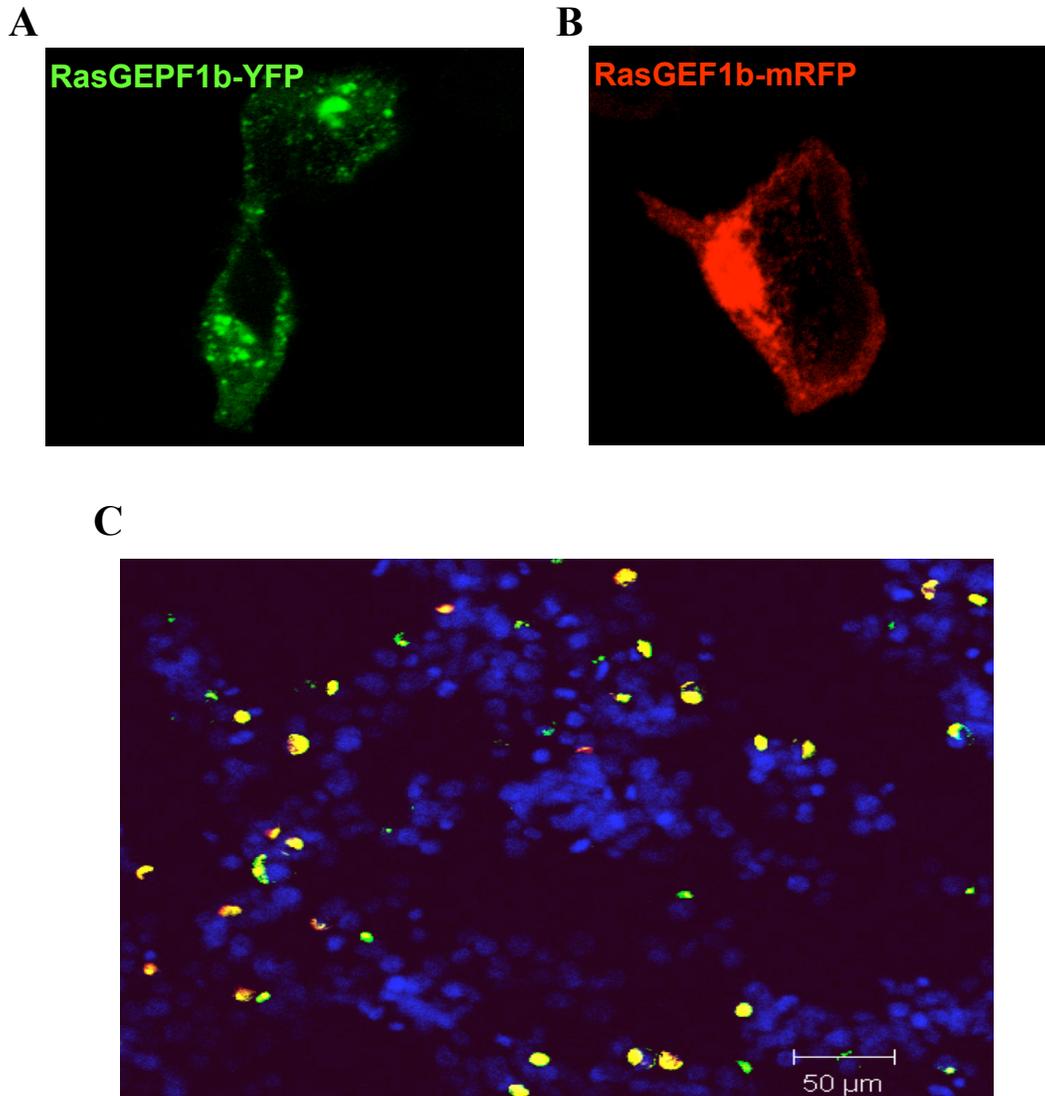


Figura 11. Marcação por imunofluorescência da expressão de FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b-mRFP em células HEK 293T. A - célula HEK 293T expressando a proteína recombinante FLAGRasGEF1b-YFP e mostrando sua localização. B - célula HEK 293T expressando a proteína recombinante FLAGRasGEF1b-mRFP e mostrando sua localização subcelular. C - células HEK 293T co-expressando ambas construções. O núcleo das células e visto em azul pela coloração por DAPI. Ambas as construções co-localizaram. Em A) e B) foi utilizada objetiva para aumento de 630x, e em C) para aumento de 200x.

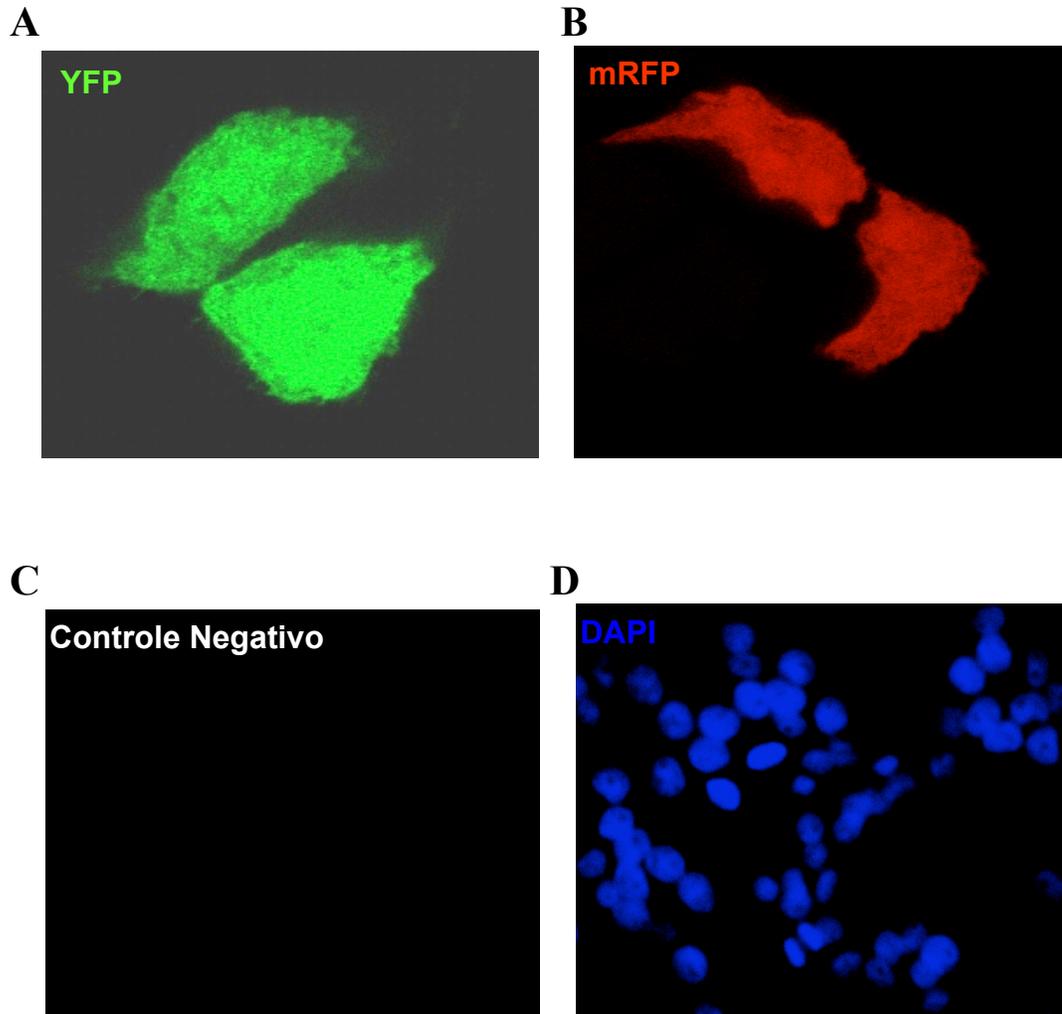


Figura 12. Marcação por imunofluorescência da expressão de YFP e mRFP em células HEK 293T e de células não transfectadas. A - células HEK 293T transfectadas com o plasmídio controle expressando YFP e mostrando sua localização em todo interior celular. B - células HEK 293T transfectadas com o plasmídio controle expressando mRFP mostrando sua localização em todo interior celular. C- células HEK 293T não transfectadas não possuem autofluorescência. D - núcleo das células e visto em azul pela coloração por DAPI. Em A) e B) foi utilizada objetiva para aumento de 630x, e em C) e D) para aumento de 200x.

Para os experimentos de localização subcelular da proteína FLAGRasGEF1b foi utilizada a célula CHO devido à sua morfologia favorecer tal procedimento (54). Essas células possuem um grande citoplasma o qual facilita a marcação de organelas intracelulares (55). As células foram transfectadas com FLAGRasGEF1b-YFP ou FLAGRasGEF1b-mRFP e foram utilizadas para análise da localização subcelular por microscopia confocal. A localização foi feita a partir da marcação de organelas intracelulares com anticorpos específicos e sobreposição com a marcação das construções expressando RasGEF1b fluorescente. Como pode ser visto na Figura 13 ocorreu à expressão da proteína FLAGRasGEF1b-RFP (B). O retículo endoplasmático foi marcado utilizando-se o marcador ER-Tracker (A), e como visto em C, não houve colocalização de FLAGRasGEF-RFP com essa organela. Existem exemplos de GEFs que se localizam no retículo endoplasmático e ativam Ras nesta organela (56). Foi utilizada marcação específica para endossomos primários, utilizando o anticorpo anti-EEA1 . Como pode ser visualizado nas Figuras 14 e 15, a proteína FLAGRasGEF1b-YFP colocaliza com os endossomos primários (D) nas células CHO, corroborando os dados de localização obtidos nos experimentos de fracionamento subcelular, apesar da maior parte estar concentrada na fração de membranas pesadas. Também utilizamos o marcador de organelas ácidas LysoTracker, e como demonstrando na Figura 16 (C), houve colocalização de FLAGRasGEF1b-RFP com organelas positivas para Lysotracker, porém quando utilizamos o marcador de lisossomos LAMP1, Figura 17, não houve colocalização deste marcador com a proteína FLAG-RasGEF1b-YFP, sugerindo que FLAGRasGEF1b se localiza entre endossomos primários e tardios.

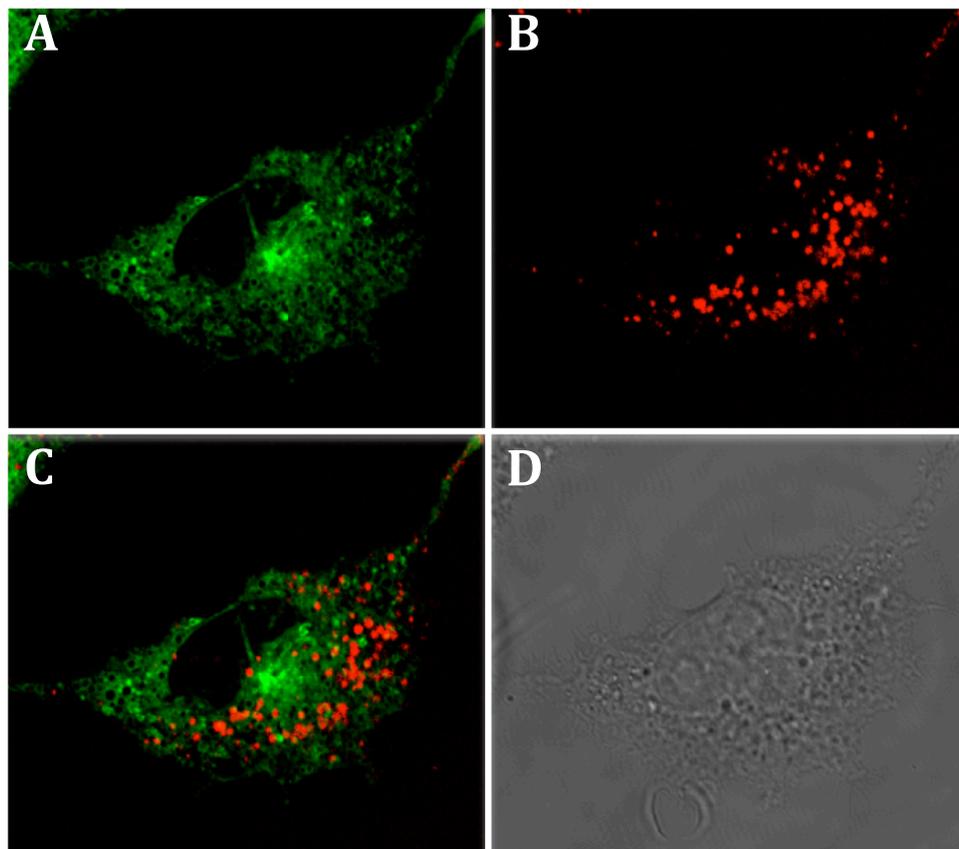


Figura 13. Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal. A – marcação de retículo endoplasmático utilizando ER-Tracker. B - expressão da proteína FLAGRasGEF1b-RFP C– sobreposição das imagens anteriores. D – DIC (*Differential interference contrast*). A proteína FLAGRasGEF1b-RFP não co-localiza com ER-tracker. Aumento 630x.

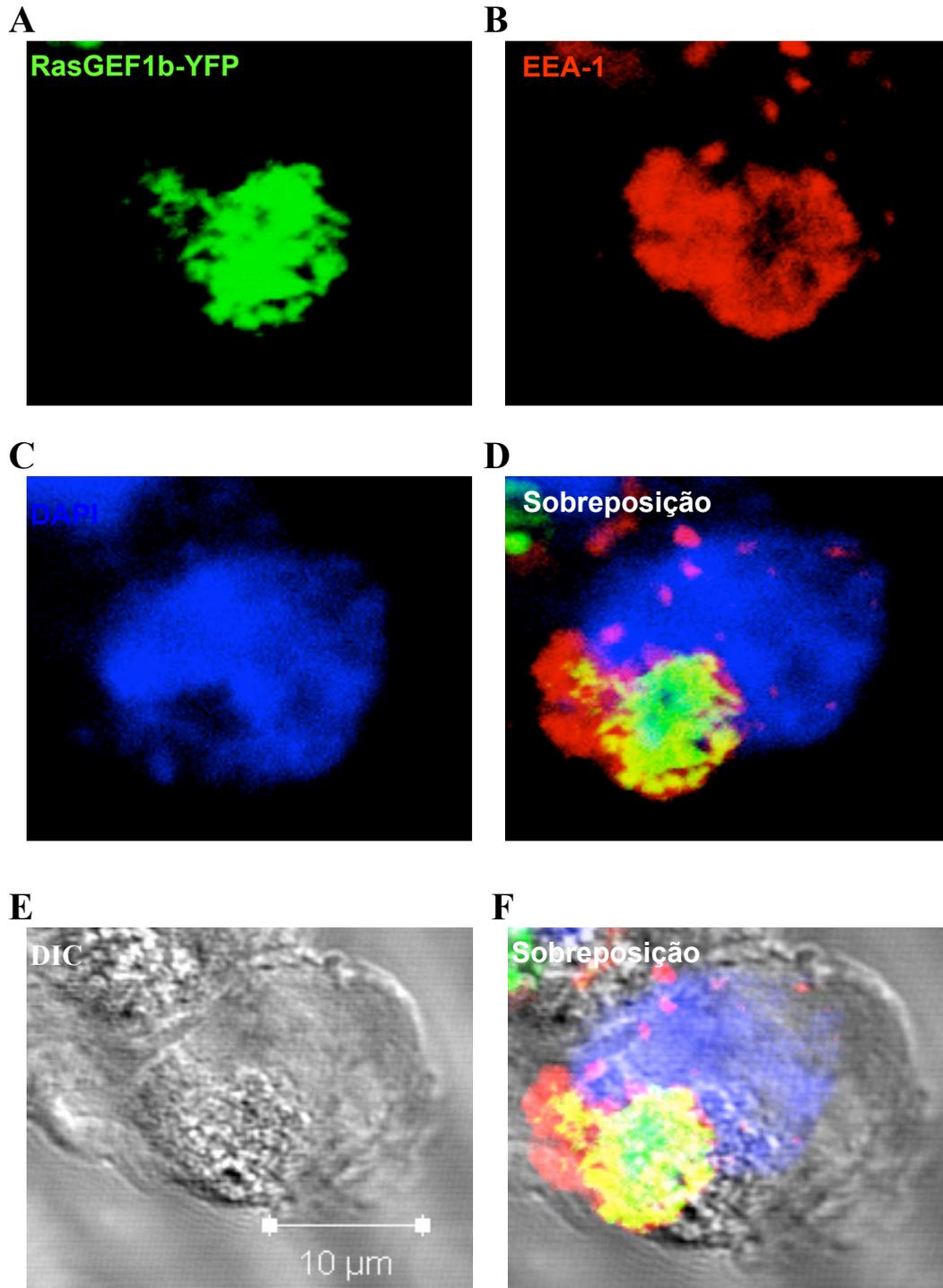


Figura 14. Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal. A – expressão da proteína FLAGRasGEF1b-YFP. B – marcação de endossomo primário utilizando anticorpo anti-EEA1. C – núcleo da célula é visto em azul pela marcação por DAPI. D – sobreposição das imagens anteriores. E – DIC (*Differential interference contrast*) F – sobreposição das imagens anteriores. A proteína FLAGRasGEF1b-YFP co-localiza parcialmente com EEA1. Aumento 630x

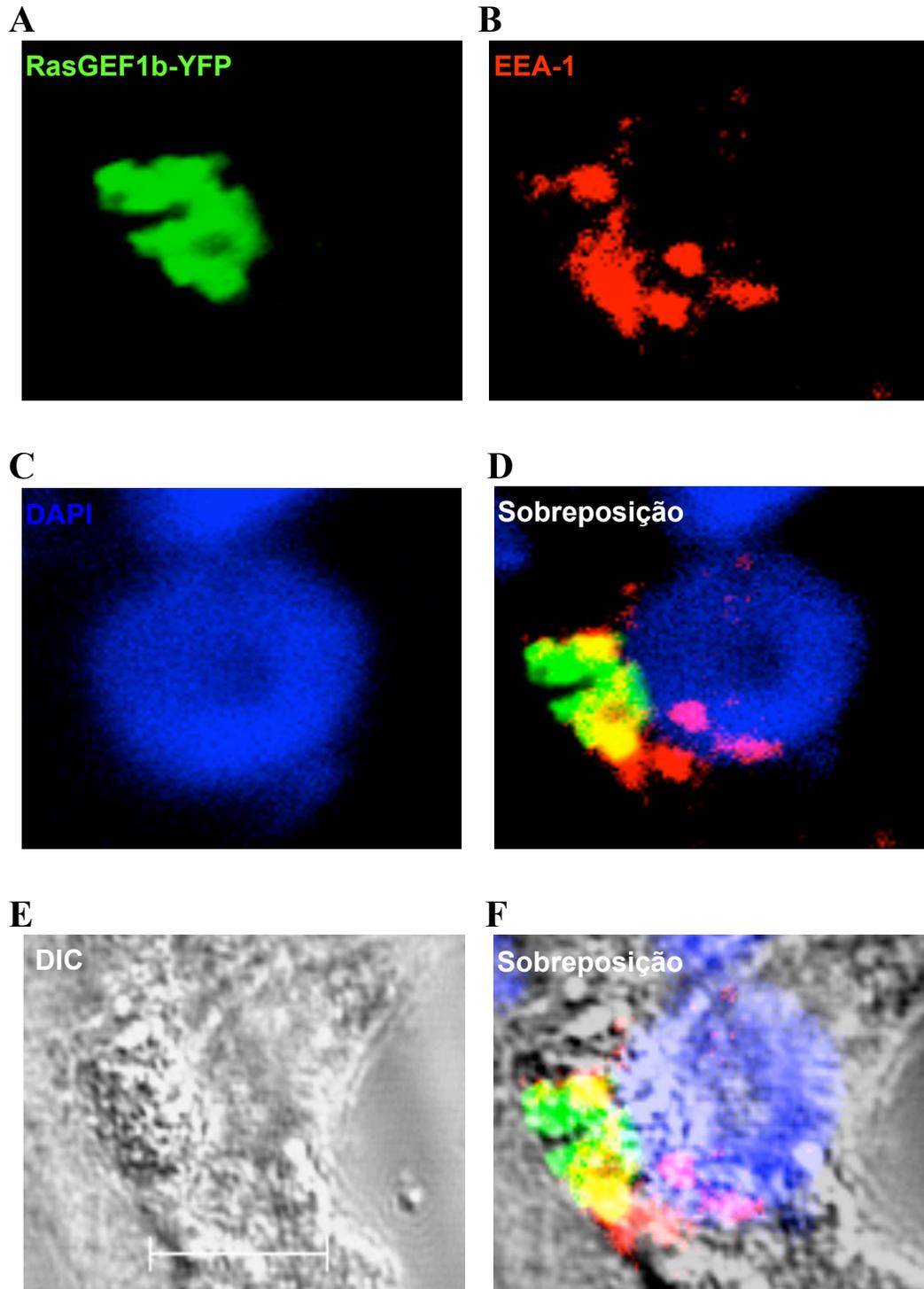


Figura 15. Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal. A – expressão da proteína FLAGRasGEF1b-YFP. B – marcação de endossomo primário utilizando anticorpo anti-EEA1. C – núcleo da célula é visto em azul pela marcação por DAPI. D – sobreposição das imagens anteriores. E – DIC (*Differential interference contrast*). F – sobreposição das imagens anteriores. A proteína FLAGRasGEF1b-YFP co-localiza parcialmente com EEA1. Aumento 630x.

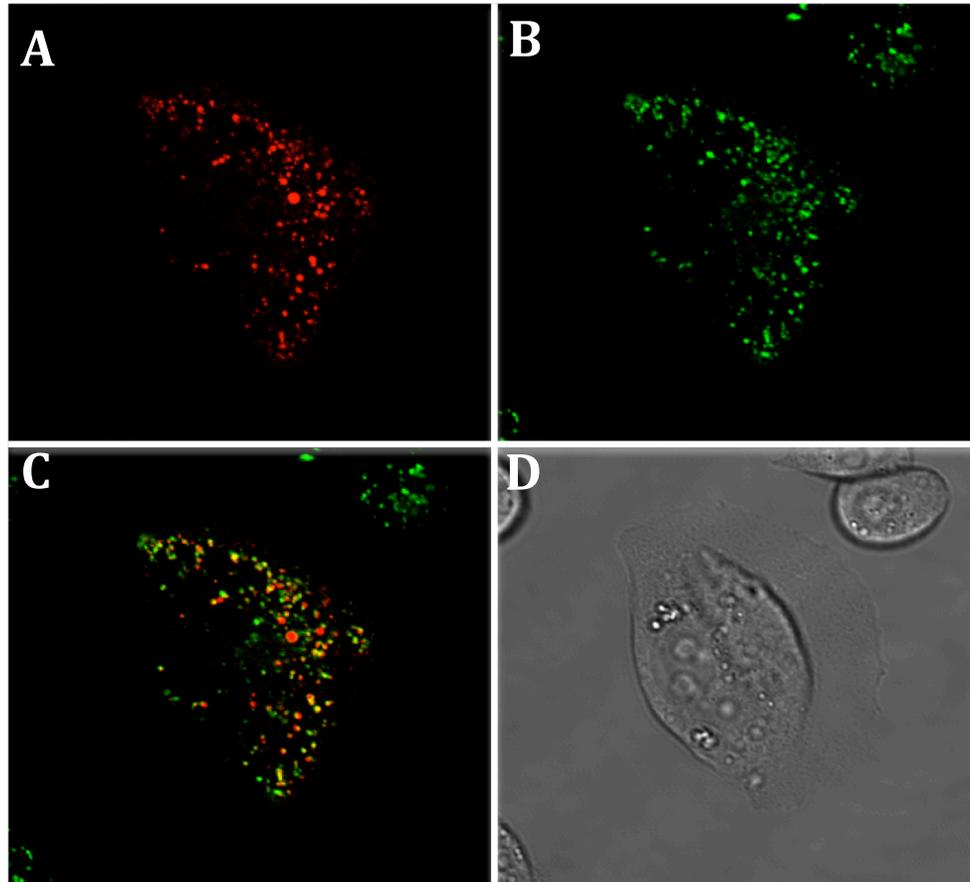


Figura 16. Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal A – expressão da proteína FLAGRasGEF1b-RFP. B – marcação de endossomos utilizando LysoTracker. C – sobreposição das imagens anteriores. D – DIC (*Differential interference contrast*). A proteína FLAGRasGEF1b-mRFP co-localiza parcialmente com LysoTracker. Aumento 630x.

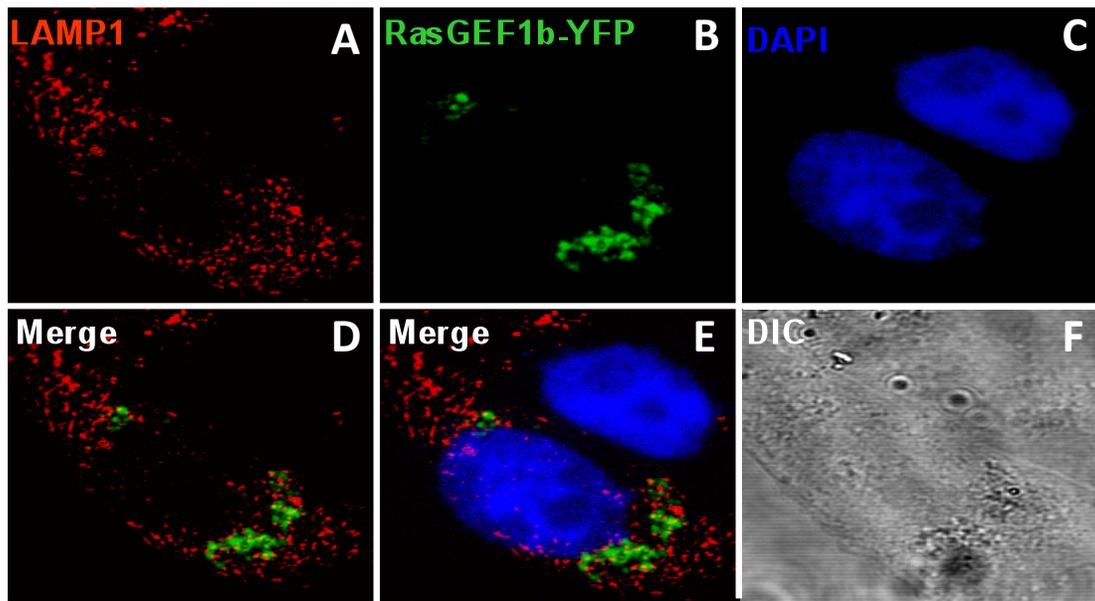


Figura 17. Marcação por imunofluorescência para localização subcelular de FLAGRasGEF1b em células CHO, por microscopia confocal confocal A - marcação de endolisossomos utilizando anticorpo anti-Lamp1. B - expressão da proteína FLAGRasGEF1b-YFP. C – núcleo da célula é visto em azul pela marcação por DAPI. D/E – sobreposição das imagens anteriores. F – DIC (*Differential interference contrast*). A proteína FLAGRasGEF1b-YFP não colocaliza com Lamp1. Aumento 630x.

Como controles experimentais dos experimentos de microscopia confocal, células CHO não transfectadas e marcadas somente com os anticorpos secundários Alexa Flúor 488 e Alexa Flúor 633 foram analisadas por microscopia confocal. Como observado na Figura 18A e B, os anticorpos secundários na mesma diluição utilizada nos experimentos de localização de FLAGRasGEF1b-YFP ou mRFP não marcam inespecificamente as células CHO. Como observado em C e D as células não transfectadas não possuem autofluorescência.

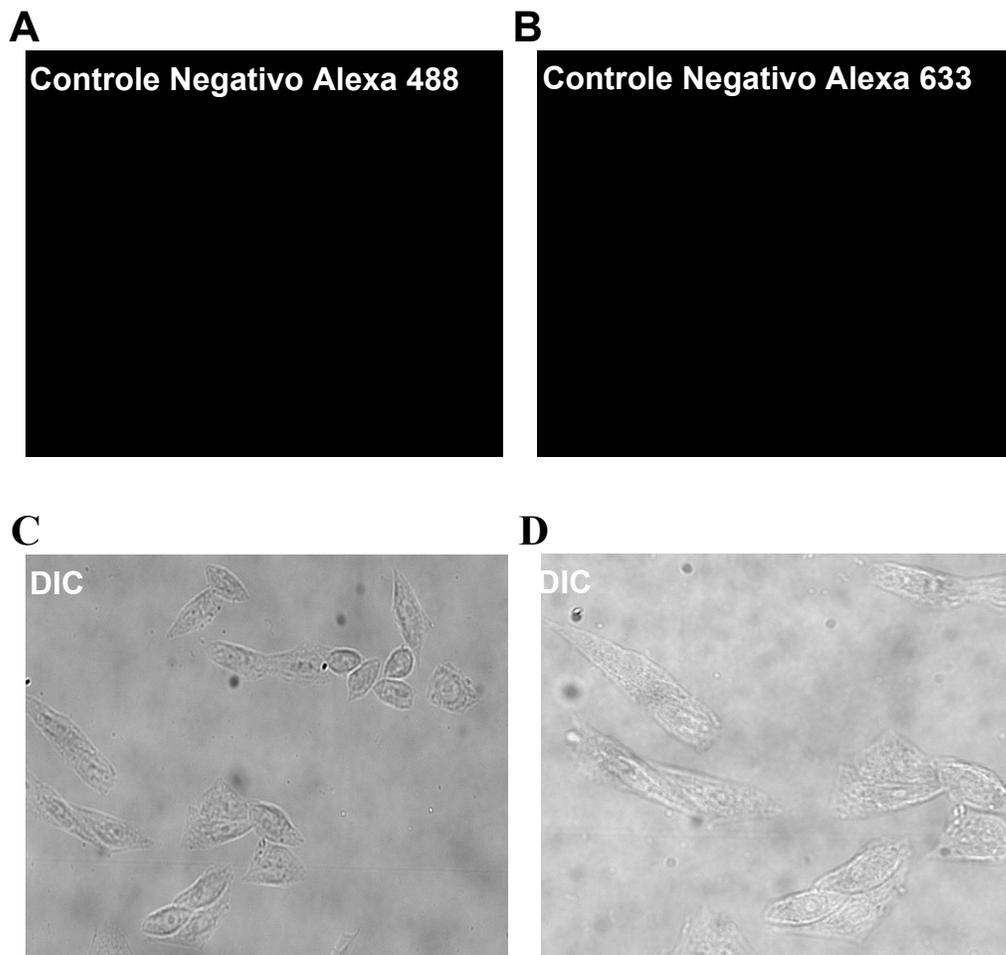


Figura 18. Imagens de microscopia confocal de células CHO não transfectadas. A – células CHO não transfectadas e incubadas somente com anticorpo secundário Alexa Fluor 488. B - células CHO não transfectadas e incubadas somente com anticorpo secundário Alexa Fluor 633. C e D – DIC (*Differential interference contrast*). Células CHO não transfectadas não possuem autofluorescência. Em C aumento de 400x e em D aumento de 630x.

5.7 Inibição da expressão da proteína FLAGRasGEF1b-YFP por RNA de interferência

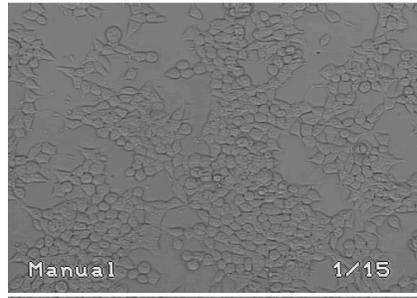
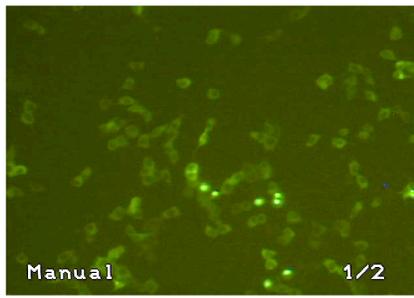
A técnica de RNAi tem sido muito utilizada para a análise de função de proteínas por inibir estavelmente sua expressão para posterior avaliação do fenótipo (57 - 60). Células HEK 293T foram cotransfectadas com a construção FLAGRasGEF1b-YFP e com os plasmídios expressando o shRNA dirigido especificamente para inibição do RNAm de RasGEF1b ou com um shRNA não relacionado, como controle negativo. Como visto na Figura 19B e C, na análise das células transfectadas realizada por microscopia de fluorescência, ambos shRNAs 93 e 96 para RasGEF1b

inibiram praticamente 100% da expressão da proteína FLAGRasGEF-YFP, já o shRNA 63 não relacionado não inibiu a expressão da proteína ectópica RasGEF1B, visto em D, ambos comparados com o controle mostrado em A. O mesmo resultado pode ser visto na Figura 20 pela análise por citometria de fluxo. Em A vimos a população de células HEK 293T utilizada no experimento. Em B está demonstrada a porcentagem de células transfectadas (2,4%) com FLAGRasGEF1b-mRFP, o qual tem sua expressão inibida, C, na presença do shRNA dirigido contra o RNAm de RasGEF1b.

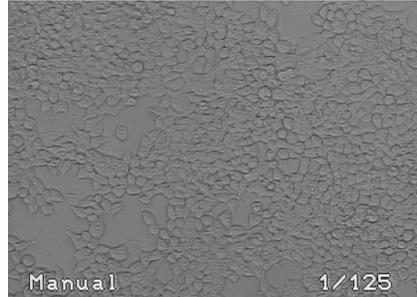
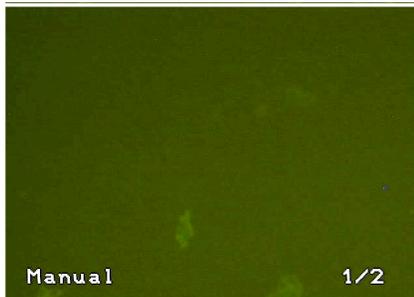
5.8 Ativação de Ras pela proteína FLAGRasGEF1b

Para o experimento com o objetivo de analisar o potencial papel de RasGEF1b na ativação da *small* GTPase Ras, foram utilizadas células HEK 293T transfectadas com as construções FLAGRasGEF1b-YFP ou FLAGRasGEF1b, e 48h após foi avaliada a ativação da GTPase evidenciada pela ativação da proteína efetoras Raf-1, utilizando um kit comercial da ativação de Ras (Upstate). Quando Ras liga-se a GTP, isto é, quando é ativada ocorre uma mudança conformacional na proteína que favorece sua interação com as proteínas efetoras (61), sendo a principal delas a Raf-1 (62). Como mostrado na Figura 21, ambas as construções foram capazes de ativar Ras através da troca de GDP por GTP, e conseqüente ativação de Raf-1, indicando que RasGEF1b de *Mus musculus* é capaz de atuar como fator de troca de guaninas de Ras, sendo assim uma RasGEF, pelo menos *in vitro*.

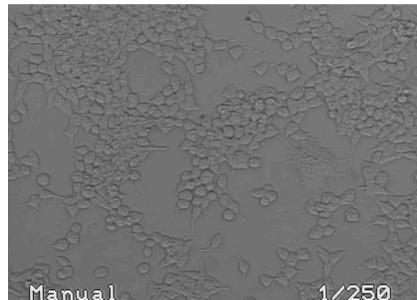
A



B



C



D

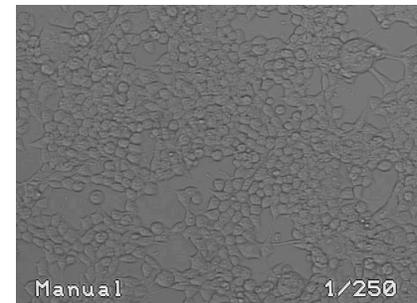
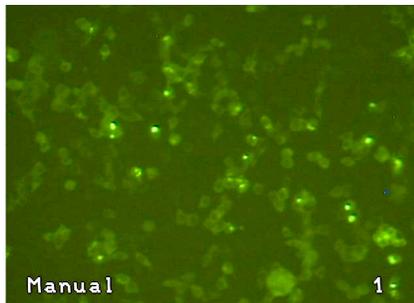


Figura 19. Imagens por microscopia de fluorescência da inibição da expressão de FLAG-RasGEF1b-YFP por RNAi. A – células HEK 293T transfetadas com a construção *flagrasGEF1b-YFP*. B – células HEK 293T co-transfetada com *flagrasGEF1b-YFP* e shRNA93. C - células HEK 293T co-transfetada com *flagrasGEF1b-YFP* e shRNA96 D - células HEK 293T co-transfetada com *flagrasGEF1b-YFP* e shRNA63. Os quadros à direita representam as imagens de campo claro.

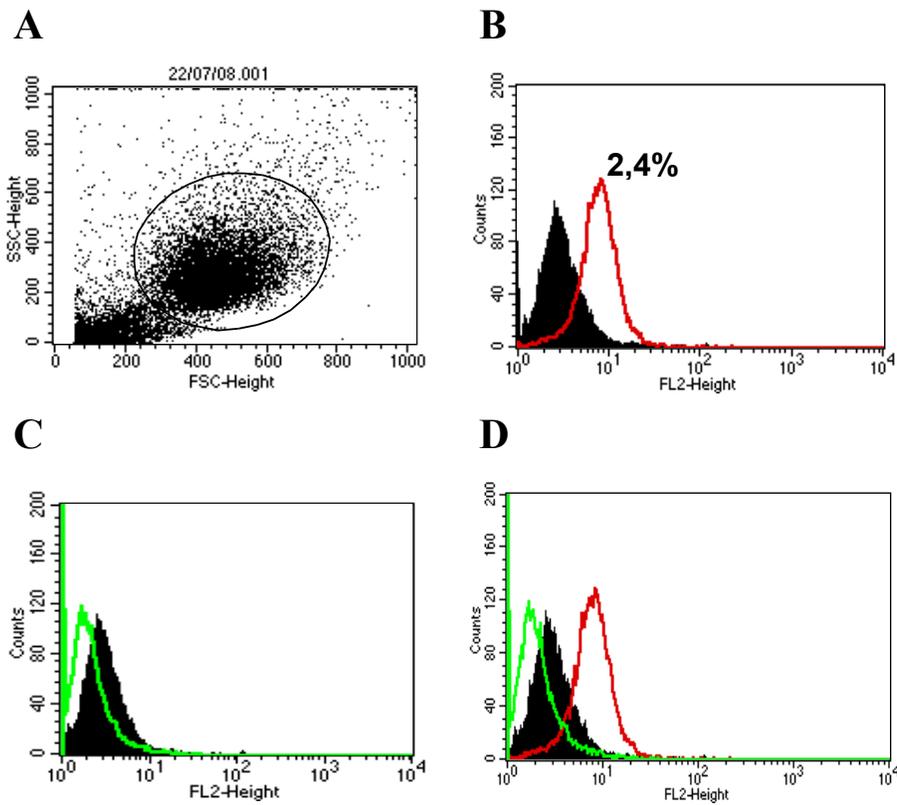


Figura 20. Análise por citometria de fluxo da inibição da expressão de FLAGRasGEF1b-mRFP por RNAi. A – população de células HEK 293 T utilizada na análise. Gráfico de tamanho (eixo x) X granulidade (eixo Y). B – células HEK 293T transfectadas com FLAGRasGEF1b-mRFP. C – células HEK 293T co-transfectadas com FLAGRasGEF1b-mRFP e shRNA dirigido contra RasGEF1b. D – Sobreposição das imagens B e C. Como visto o shRNA para RasGEF1b foi capaz de inibir a expressão da proteína recombinante FLAGRasGEF1b-mRFP.

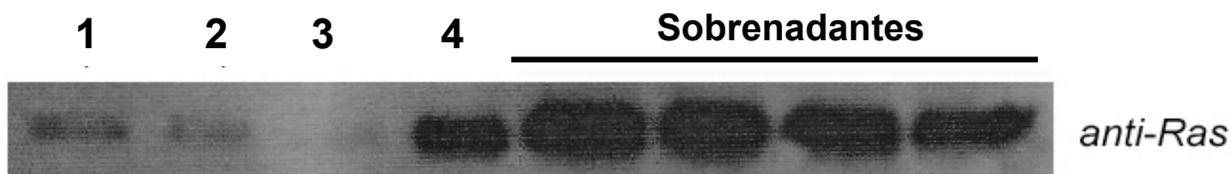


Figura 21. Ensaio de ativação de Ras pelas proteínas FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b. 1- células HEK 293T transfectadas com FLAGRasGEF1b-YFP. 2 - células HEK 293T transfectadas com FLAGRasGEF1b. 3 - células HEK 293T transfectadas com pcDNA3-YFP e adicionado GDP (controle negativo) 4 - células HEK 293T transfectadas com pcDNA3-YFP e adicionado GTP (controle positivo). Os sobrenadantes indicam as quatro respectivas frações (1 a 4), demonstrando a presença da proteína Ras. FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b foram capazes de ativar Ras *in vitro*.

5.9 Expressão e purificação da proteína recombinante His-RasGEF1b

A célula hospedeira escolhida para a expressão da proteína recombinante foi uma linhagem de *Escherichia coli*, denominada XL1-Blue, baseado nas características convenientes de cultura dessa cepa, sistemas de expressão gênica bem desenvolvidos e a habilidade da produção da proteína necessária em larga escala. Entretanto, como em qualquer sistema de expressão procariótico, não há modificações pós-traducionais na proteína recombinante (63, 64). A bactéria XL1-Blue (*E. coli*) transformada com a construção pQE-30 His6-RasGEF1b foi induzida a 37°C com IPTG 1mM, condições estas que favorecem a formação de proteínas insolúveis, já que em trabalhos anteriores com esta proteína de fusão não foi possível purificação a partir da fração solúvel.

A expressão de His-RasGEF1b recombinante foi induzida por 4 e 6h após adição de IPTG. Como mostrado na Figura 22A, a massa molecular da proteína His6-RasGEF1b recombinante foi de 52,8 kDa, o qual corresponde a da proteína RasGEF1b fusionada a 6 histidinas. Como já esperado, a proteína se encontrou na fração insolúvel. His6-RasGEF1b foi purificada da fração insolúvel após solubilização em Uréia Para isso His6-RasGEF1b ressuspensa em uréia foi fracionada em SDS-PAGE e eluída em água por difusão passiva. Esta técnica foi desenvolvida por pesquisadores do grupo estrutural da FAPESP (DMIP- UNIFESP- São Paulo) e tem sido amplamente empregada para a produção de soros hiperimunes dirigidos contra proteínas recombinantes fundidas a His6. A figura 22B mostra a purificação da proteína.

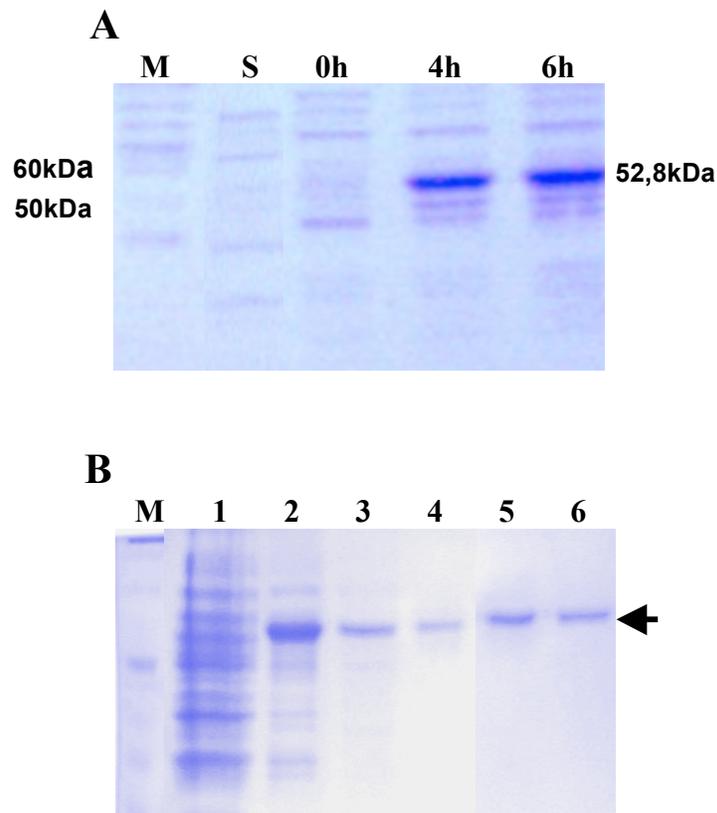


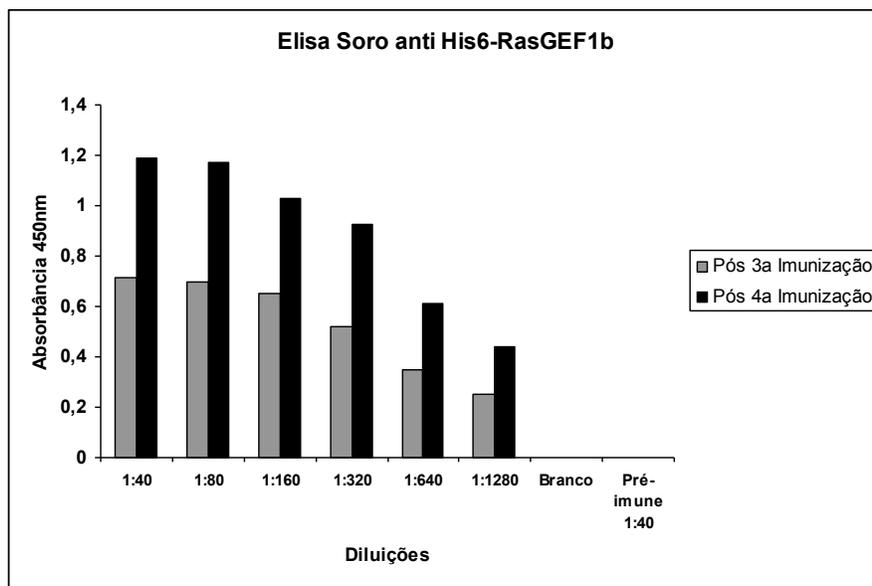
Figura 22. Expressão e purificação da proteína recombinante His6-RasGEF1b (SDS-PAGE 12%). Os géis foram corados com azul de Coomassie. **A)** M – Marcador de massa molecular; S – Fração solúvel; 0h – Sedimento do cultivo de bactéria não induzido com IPTG; 4h e 6h – Sedimento de cultivo de bactéria induzido com IPTG 4 e 6h respectivamente. **B)** M – Marcador de massa molecular; 1 – extrato total antes da indução com IPTG; 2 e 3 – Primeira eluição; 4 a 6 – Segunda eluição. A seta aponta a proteína His6-RasGEF1b.

5.10 Produção de anticorpos policlonais dirigidos contra a proteína recombinante His6-RasGEF1b em coelho.

Para verificar a presença de anticorpos policlonais contra a proteína recombinante His6-RasGEF1b foram realizados ensaios de ELISA e *Western Blotting*. Amostras de soro coletadas antes da primeira imunização, e após a quarta imunização dos coelhos foram tituladas por ELISA em diluições seriadas como visto na Figura 23A. Observamos que o soro pós-imunização foi capaz de reconhecer eficientemente a proteína recombinante em todas as diluições testadas. Na Figura 23B confirmamos o reconhecimento de His6-RasGEF1b (20ng de proteína purificada) e

FLAGRasGEF1b (20µg de extrato de células transfectadas), pelo soro imune de, apesar da presença de um banda fraca na membrana incubada com o soro pré-imune, aparentemente com a mesma massa molecular de FLAGRasGEF1b. Estes resultados são preliminares, e o teste do soro imune, após a 4ª dose, será realizado utilizando concentrações variadas de proteínas purificadas de *E. coli* (2 a 20ng), extrato de proteínas totais de células de mamífero (para detecção da proteína endógena), bem como extrato de células de mamífero super-expressando RasGEF1b.

A



B

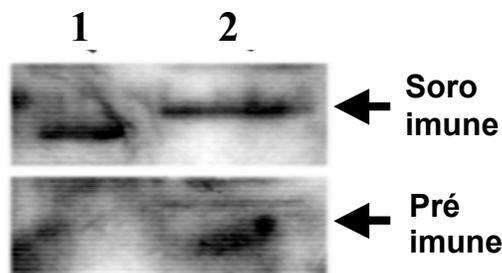


Figura 23. Análise por ELISA e *Western blotting* da produção de anticorpos policlonais dirigidos contra a proteína recombinante His6-RasGEF1b. A) Elisa com o soro dos coelhos após 3ª e 4ª imunizações. Em todas as diluições testadas houve reconhecimento pelo soro imune da proteína recombinante His6-RasGEF1b. B) *Western blotting* com o soro dos coelhos após a 3ª imunização. Houve reconhecimento pelo soro das proteínas recombinantes His6-RasGEF1b (1) e FLAGRasGEF1b (2).

6. Discussão

A habilidade do *Trypanosoma cruzi* em ativar macrófagos, é, pelo menos em parte, atribuída às âncoras de glicosilfosfatidilinositol de glicoproteínas (GPI-mucinas) expressas na superfície da forma tripomastigota do parasita. As técnicas de DDRT-PCR (*differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) e o Northern blot reverso (*reverse Northern blot*) foram utilizadas para estudar a modulação da expressão gênica em macrófagos murinos expostos a GPI-mucinas e em tecidos cardíacos de camundongos infectados com *T. cruzi*. Entre os vários cDNAs identificados, originados dos RNAs mais abundantes presentes em macrófagos estimulados com GPI-mucinas, quando comparados a células não estimuladas, foi confirmado em nosso laboratório a expressão diferencial de A1, interleucina 18, e *gpiγ4* (o qual foi renomeado *rasGEF1b*). Alguns desses genes mostraram também expressão acentuada em tecido cardíaco (A1 e *rasGEF1b*) de animais infectados. Além disso, também foi verificada a expressão do *rasGEF1b* em clones de linfócitos Th1 e Th2 murinos pré-ativados por mitógenos, mas não em linfócitos sem pré-ativação. Esses resultados conectam claramente a expressão do *rasGEF1b* a ativação de macrófagos e linfócitos. A expressão do *rasGEF1b* mostrou-se acentuada em monócitos humanos estimulados com GPI-mucinas ou lipopolissacarídeos de bactérias (LPS). O gene *rasGEF1b* possui uma única cópia presente em camundongos e também no genoma humano. O gene murino apresenta homologia a diferentes membros da família dos fatores de troca de nucleotídeos guanina, e a provável proteína expressa, possui uma identidade de 97,6% com a RasGEF1b humana (15).

O objetivo principal deste estudo foi à caracterização parcial da função da proteína RasGEF1b e a determinação da sua localização subcelular. Para isso, ferramentas de bioinformática foram utilizadas para a análise de sua localização subcelular. Além disso, a localização subcelular desta proteína foi estudada por expressão da proteína recombinante FLAGRasGEF1b em células de mamífero e localização por fracionamento subcelular, e também foi estudada por microscopia confocal utilizando a construção da proteína FLAGRasGEF1b fusionada às proteínas fluorescentes mRFP e YFP. Para caracterização parcial da função foi utilizado um ensaio para teste da capacidade de RasGEF1b na ativação de Ras.

Como dito anteriormente, a proteína RasGEF1b possui um domínio RasGEFN na porção N-terminal, e foi visto anteriormente que na proteína Sos humana, um fator de troca de nucleotídeos guanina, este domínio parece ter apenas função estrutural (24). O RasGEFN apresenta uma padrão

de zíper de leucina que está normalmente envolvido na associação com outras proteínas. Isto pode ser importante para ativação da Ras já que é necessário que ambos, RasGEF e Ras, estejam diretamente ligados e também ligados à membrana (65, 66). Um outro domínio presente é o domínio catalítico RasGEF C-terminal, que está relacionado com a troca de GDP por GTP. Na *Sos* humana foi demonstrado claramente a interação deste domínio com a GTPase Ras, e sua atividade de catálise na troca de GDP por GTP (24). Essa homologia demonstrada corrobora a nossa hipótese de que a proteína RasGEF1b tem como principal função a troca de nucleotídeos guanina para a ativação da proteína Ras. O domínio RasGEF é também encontrado em todos os GEFs específicos para proteínas Ras. Domínios similares foram primariamente encontrados em leveduras como CDC25, protótipo dos RasGEFs, (67) e SCD25 (68) e que estão envolvidos na germinação de esporos e divisão celular respectivamente.

Atribuir uma localização celular para uma proteína é um importante passo para elucidar seus padrões de interação, função e seu potencial papel na maquinaria celular (69). A célula eucariótica é subdividida em vários compartimentos e a transferência de proteínas entre estes compartimentos é altamente regulada em processos específicos (70). Por exemplo, a importação nuclear é mediada por um grande número de proteínas que ciclam entre citosol e núcleo, incluído as importinas α e β e a *small* GTPase Ran (71).

Dos programas de bioinformática utilizados para localização celular, pTarget, NucPred e MultiLoc forneceram localização citoplasmática para o RasGEF1b. Os programas DBsubloc e Psort forneceram localização nuclear. O programa pTarget possui alta sensibilidade e especificidade. A predição menos confiável de pTarget é em relação a proteínas citoplasmáticas. Isto se deve ao fato do citoplasma ser o local da síntese de proteínas e o centro do metabolismo celular, por isso é provável que este tenha o maior número de domínios funcionais compartilhados (72). O programa MultiLoc através de novas abordagens e baseando-se na composição total de aminoácidos, seqüência alvo N-terminal e motivos de proteínas conseguiu aperfeiçoar a predição da localização celular de proteínas principalmente no que se refere ao citoplasma, retículo endoplasmático, Golgi e lisossomo, e alcançou uma precisão de 75% (Psort 60%) (73), fornecendo uma predição de localização citoplasmática de RasGEF1b com 92% de confiabilidade. É possível que o RasGEF1b esteja localizado nos dois compartimentos, entretanto, a localização celular no citosol não é condizente com os resultados obtidos em laboratório, nos quais a proteína FLAGRasGEF1b encontra-se nas frações de membranas pesadas e núcleo.

O fracionamento subcelular permite a separação de organelas baseado nas suas propriedades físicas e consiste em dois passos principais: rompimento da organização celular (homogeneização) e fracionamento do homogenato para separar as diferentes populações de organelas. O homogenato pode então ser separado por centrifugação diferencial em várias frações. Foi detectada a presença da proteína FLAGRasGEF1b principalmente nas frações de membranas pesadas e nucleares, sendo que nesta última estava em menor quantidade. Uma pequena quantidade de RasGEF1b foi detectada na fração de membranas leves. A fração de membranas pesadas compreende a membrana plasmática, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomos e endossomos tardios (74). Entretanto o fracionamento muitas vezes não é completo, e geralmente pode ocorrer contaminação entre as frações (45).

Para a expressão e localização subcelular da proteína FLAGRasGEF1b foram utilizadas células HEK 293T e CHO, devido a sua fácil manipulação e por serem linhagens comumente usadas em abordagens de microscopia confocal (50, 51). Para tal finalidade, foi feita a construção na qual a proteína FLAGRasGEF1b foi fusionada as proteínas fluorescentes YFP e mRFP. Nos dados obtidos observamos que as proteínas FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b-mRFP foram expressas eficientemente em ambas as linhagens celulares e mostraram um localização externa ao núcleo. Esse resultado vai contra alguns dados de bioinformática que mostram localização nuclear para o RasGEF1b e que identificaram três sítios de direcionamento nuclear para o mesmo. De fato ambos os resultados são possíveis, pois outros GEFs tais como RCC1 (75) e CDC42 (76) foram encontrados, localizados e direcionados para o núcleo sob certas condições fisiológicas, apesar de possuírem localização em membranas ou no citoplasma, como a maioria dos GEFs conhecidos (77, 78). Nos experimentos realizados em células CHO, no qual se analisou uma possível colocalização das proteínas FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b-mRFP com os marcadores ER-Tracker, específico para o retículo endoplasmático, anticorpo anti-EEA1 para marcação de endossomos primários, marcador LysoTracker para organelas ácidas, e anticorpo anti-LAMP1 para lisossomos, identificamos a presença destas proteínas em endossomos primários e endossomos tardios, corroborando nossos dados de fracionamento celular. FLAGRasGEF1b recombinante não é o primeiro exemplo de GEF presente nessas organelas, como visto por PDZ-GEF1 e RAP6 (79, 80). A colocalização de RasGEF1b com os marcadores EEA1 e LysoTracker sugerem que a função celular deste provável fator de troca de guaninas, pode estar ligada ao tráfego de vesículas (80, 81), pois RasGEF1b se encontra entre os endossomos primários e tardios.

A localização celular da proteína FLAGRasGEF1b em endossomos primários e endossomos tardios nos dá um indício de que esta pode estar envolvida no tráfego de vesículas, pois Rab 5, que é o regulador chave inicial da endocitose, está presente em endossomos primários quando ativado, e provavelmente seu GEF ativador se encontra presente nessas vesículas. Foi visto que Rab 5 está envolvido na internalização de EGFR (*epidermal growth factor receptor*) e sinalização via ERK para proliferação celular (82, 83). Um outra proteína presente da mesma família, Rab 7, está presente nos lisossomos e é importante para endocitose e formação do fagolisossomo (81, 84, 85). Como FLAGRasGEF1b está presente nessas organelas, sua função poderia ser de ativação de alguma proteína da subfamília Ras ainda não identificada, ou mesmo de alguma já conhecida, pois como já é conhecido, a maioria dos GEFs não são específicos, tão como as proteínas Ras (86 - 88).

GTPases das família Ras e Rho controlam vários processos celulares, e foi relatado entre estes processos o controle da sinalização via TLRs. Ras e Raf-1 são essenciais para ativação de ERK1 e 2 em células estimuladas por LPS via TLR4, já Rap1 e B-Raf são essenciais para ativação por flagelina via TLR5 (89). Entretanto, somente poucos dados conectam GEFs a receptores do tipo *Toll* (32, 37, 90, 91). A ativação de ambas as vias, NF- κ B e MAPKs, é necessária para que ocorra a completa ativação de células imunes via sinalização por *Toll* (92), portanto fatores de troca de nucleotídeos guanina também estão envolvidos nesta ativação, apesar dessa função ainda ser pouco conhecida. AKAP13, uma proteína de ancoramento de membrana com atividade GEF, tem sua expressão induzida pelo agonista de TLR2 Pam3Cys. Foi demonstrado que AKAP13 ativa a proteína Rho e conseqüentemente NF- κ B e JNK que induz a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e MCP-1 (32). A secreção de TNF e expressão de iNOS pela ativação de macrófagos por GpG DNA é dependente da fosforilação de vav1 (37).

Foi demonstrado que Ras participa na sinalização via TLR9 sob a indução por CpG DNA em macrófagos. Utilizando inibidores de Ras e/ou Ras mutantes, foi demonstrado que Ras está envolvida na ativação de ERK, JNK e NF- κ B, e é requerida para secreção de TNF e óxido nítrico. Verificou-se que não há um aumento na quantidade da proteína Ras, e sim na quantidade de Ras ativa ligada a GTP (93). Com isso podemos especular que houve uma maior atividade do(s) GEF(s) responsável pela ativação da Ras. Através de experimentos realizados em nosso laboratório, vimos que *rasGEF1b* tem sua expressão induzida por diferentes agonistas de TLR em macrófagos murinos da linhagem Raw264.7 *in vitro* e em camundongos infectados com *T. cruzi* e *Plasmodium Chabaudi*, incluindo entre eles TLR9 (Salgado APC dados não publicados). Isso nos leva a

especular que RasGEF1b pode ser induzido em infecções por parasitas para aumentar a ativação de Ras e a resposta imune do hospedeiro contra o parasita. Em macrófagos e células dendríticas em repouso, TLR9 se encontra no retículo endoplasmático (94, 95), e quando ativado migra para o lisossomo via endossomos para realizar sua função. Como Ras é necessária para ativação de macrófagos via TLR9 (93), e RasGEF1b se encontra em endossomos primários e endolisossomos, este pode ser um GEF candidato a ativar a proteína Ras responsável pela ativação de TLR9.

RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo que inibe a expressão gênica na fase de tradução ou dificulta a transcrição de genes específicos. Os alvos do sistema RNAi incluem RNAs de vírus e transposons (96), e também desempenham um importante papel em fases iniciais do desenvolvimento (97). O genoma dos mamíferos abriga numerosos RNAs não codificantes, incluindo RNAs nucleolares pequenos (snoRNAs *small nucleolar RNAs*), microRNAs (miRNAs) e pequenos RNAs de interferência (siRNAs *short interfering RNAs*) (98 - 100), sendo os dois últimos pertencentes ao grupo dos RNAi. A distinção entre siRNAs e miRNAs tem se tornada complexa pois ambos são produzidos por vias similares e possuem mecanismos de ação parecidos (101). Observações indicam que ambos podem reprimir a tradução, no caso de pareamento imperfeito destes com o RNAm, e também podem clivar o alvo no caso de pareamento perfeito (102, 103).

A maioria das células de mamíferos possuem uma resposta antiviral potente que é disparada na presença de RNA de fita dupla (dsRNA), sendo o componente chave desse processo a proteína cinase ativada por dsRNA (PKR *dsRNA-activated protein Kinase*) (104). Entretanto foi demonstrado que pequenos duplex de RNA que mimetizavam os produtos da Dicer eram capazes de ativar o sistema RNAi e escapar da atividade antiviral da célula (105, 106). Porém uma desvantagem do uso do siRNA é que seus efeitos são transientes e dependem muito do tipo celular utilizado.

A expressão contínua de longos RNAs em forma de grampo foi capaz de inibir a expressão gênica (107), entretanto esta abordagem foi utilizada em células com defeito no sistema PKR. Construções cuja expressão esta controlada pelo promotor U6 foram desenvolvidas para silenciamento contínuo de um gene alvo (108). Foi demonstrado que pequenos RNAs em forma de grampo (shRNAs *short hairpin RNAs*) introduzidos ou sintetizados *in vivo* pela RNA polimerase III (pol III), são capazes de gerar linhagens contínuas de células expressando o shRNA e com o gene alvo silenciado (108). Através da metodologia dos shRNAs inibimos a expressão das proteínas recombinantes FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b-mRFP.

Proteínas Ras quando ativadas pela troca de GDP por GTP, sinalizam *downstream* pela ativação de diversos efetores, incluindo entre eles Raf-1 (16, 61, 62). RasGEF1b expresso em células HEK 293T foi capaz de mediar a troca de GDP por GTP em Ras, e consequentemente ativar Raf-1. Esses resultados indicam que RasGEF1b é um fator de troca de nucleotídeos guanina para a proteína Ras, *in vitro*.

Ao mesmo tempo em que novos GEFs estão sendo descobertos, está ficando cada vez mais evidente que os mecanismos moleculares pelos quais os GEFs ativam as *small* GTPases são tão variados quanto os próprios GEFs, e que a especificidade de parceria entre GEF e GTPase é mais uma questão de localização do que propriamente de interação (79, 109)

7. Conclusão

A análise do sequenciamento da região codificadora do gene *gpiγ4* demonstrou que a proteína codificada por este gene possui os domínios RasGEFN e RasGEF, e determinou sua classificação como membro hipotético da família RasGEF, sendo assim denominado *rasGEF1b*. A proteína codificada por esse gene, a RasGEF1b, é altamente conservada em diferentes espécies filogeneticamente distintas.

A proteína FLAGRasGEF1b foi expressa em modelo eucarioto e está localizada principalmente nas frações de membranas pesada e núcleo, sendo que através de microscopia confocal verificamos que FLAGRasGEF1b encontra-se em endossomos primários e endossomos tardios, e ausente do núcleo.

Através do ensaio de ativação de Ras, as proteínas FLAGRasGEF1b e FLAGRasGEF1b-YFP foram capazes de ativar a proteína Ras, confirmando sua função como fator de troca de guaninas, *in vitro*.

Utilizando o RNAi, fomos capazes de inibir a expressão das proteínas FLAGRasGEF1b-YFP e FLAGRasGEF1b-mRFP com os shRNAs utilizados.

Produzimos anticorpos policlonais dirigidos contra a proteína His6-RasGEF1b em coelhos (*O. cuniculus*), que serão extremamente importantes para a caracterização funcional da proteína endógena.

8. Perspectivas

Até o presente momento a função completa do RasGEF1b permanece desconhecida. Considerando este fato, novos experimentos serão realizados na tentativa de estabelecer sua função. Estão em andamento experimentos de ativação de células HEK 293T expressando estavelmente *Toll* 2, 4, e 9, juntamente com a expressão de FLAGRasGEF1b-mRFP. Como a expressão do RNAm de RasGEF1b é induzida por agonistas de *Toll*, talvez ocorra alguma mudança da localização celular de RasGEF1b após a ativação via TLRs. Experimentos de microscopia confocal com marcação de diferentes proteínas Ras serão realizados para análise de uma possível co-localização com FLAGRasGEF1b.

Para estudo de função, está em andamento a produção de vírus carreando os shRNAs dirigidos para a mensagem de RasGEF1b, objetivando a obtenção de linhagens de macrófagos Raw264.7 expressando estes shRNAs de forma estável (Dra. Viviane A. Gouveia – FIOCRUZ/UFMG), bem como a obtenção de camundongos nocaute para RasGEF1b. Com a obtenção dos *knock-down* (RNAi) e *Knock-out* (animais nocautes condicionais), poderemos estudar as possíveis vias de sinalização reguladas por RasGEF1b o que permitirá definir o papel deste GEF na resposta do hospedeiro a diferentes parasitas.

Outras análises estão sendo realizadas, como o ensaio de GST-pull down utilizando os domínios amino (N) e carboxi (C) terminais da proteína RasGEF1b para verificação da possível interação com Ras e identificação de outros ligantes (Dra. Viviane A. Gouveia), utilizando construções geradas pelo grupo do Dr. Aristóblo Mendes Silva (ICB – UFMG).

Com o anticorpo anti - RasGEF1b em mãos, ensaios de ativação de células Raw264.7 com diferentes agonistas de *Toll* serão realizados para análise da expressão da proteína RasGEF1b endógena, já que até o presente momento nosso trabalho consistiu em análise de proteínas expressas ectopicamente e até o momento não sabemos se RasGEF1b é de fato expressa, apesar de o seu RNAm ser evidenciado em diferentes ensaios e transcricionalmente induzido por agonistas de TLRs. Assim estes anticorpos são de extrema importância para verificação da regulação positiva de RasGEF1B via agonistas de TLRs. Paralelamente experimentos de localização subcelular da proteína endógena serão feitos utilizando o anticorpo policlonal obtido, por análises de microscopia confocal. Esses experimentos futuros, e os que já estão em andamento, poderão indicar o provável

envolvimento do *rasGEF1b* na ativação de vias de sinalização mediada por receptores do tipo *Toll* estimulados pelo *Trypanosoma cruzi* e outros agentes infecciosos.

9. Referências

1. Burleigh, B. A. & Andrews, N. W. (1995) The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 49, 175-200.
2. Rassi, A., Luquetti, A. O., Rassi Jr., A., Rassi, S. G. & Rassi, A. G. (1992) in *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine, Sao Paulo, Brazil*, pp. 81.
3. Brener, Z. & Gazzinelli, R. T. (1997) Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Int Arch Allergy Immunol* 114(2), 103-110.
4. Ferguson, M. A. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J Cell Sci* 112(Pt17), 2799-809.
5. Camargo, M. M., Andrade, A. C., Almeida, I. C., Travassos, L. R. and Gazzinelli, R. T. (1997) Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol* 159(12), 6131-9.
6. Camargo, M. M., Almeida, I. C., Pereira, M. E., Ferguson, M. A., Travassos, L. R. and Gazzinelli, R. T. (1997) Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages *J Immunol* 158(12), 5890-901.
7. Almeida, I. C., Camargo, M. M., Procopio, D. O., Silva, L. S., Mehlert, A., Travassos, L. R., Gazzinelli, R. T. and Ferguson, M. A. (2000) Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *Embo J* 19(7), 1476-85.
8. Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T. and Gazzinelli, R. T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite *J Immunol* 167(1), 416-23.
9. Rock, F. L., Hardman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. and Bazan, J. F. (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:588-593.

10. Medzhitov, R. and Janeway, C. A. Jr. (2000) The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* 8(10), 452-456.
11. Takeda, K., Kaisho, T. Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *The annual review of Immunology* 21, 335-376.
12. Janeway, C. A. Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
13. Silva, A. M., Pires, E. G., Abrantes, E. F., Ferreira, L. R., Gazzinelli, R. T. & Reis, L. F. (1999) Application of the differential display RT-PCR strategy for the identification of inflammation-related mouse genes. *Braz J Med Biol Res* 32(7), 845-852.
14. Ferreira, L. R., Silva, A. M., Michailowsky, V., Reis, L. F. & Gazzinelli, R. T. (1999) Expression of serum amyloid A3 mRNA by inflammatory macrophages exposed to membrane glycoconjugates from *Trypanosoma cruzi*. *J Leukoc Biol* 66(4), 593-600.
15. Ferreira, L. R., Abrantes, E. F., Rodrigues, C. V., Caetano, B., Cerqueira, G. C., Salim, A. C., Reis, L. F. & Gazzinelli, R. T. (2002) Identification and characterization of a novel mouse gene encoding a Ras-associated guanine nucleotide Exchange factor: expression in macrophages and myocarditis elicited by *Trypanosoma cruzi* parasites. *J Leukoc Biol* 72(6), 1215-27.
16. Takai, Y., Sasaki, T., Matozaki, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81:153-208.
17. Quilliam, L. A., Rebhun, J. F., Castro, A. F. (2002) A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 71:391-444.
18. Bos, J. L., Rehmann, H., Wittinghofer, A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129:865-77.
19. Mor, A. Philips, M. R. (2006) Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol* 24:771-800.
20. Khosravi-Far, R., Cox, A. D., Kato, K., Der C. J. (1992) Protein prenylation: key to ras function and cancer intervention? *Cell Growth Differ* 3:461-9.

21. Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, T., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., Philips, M. R. (1999) Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98:69-80.
22. Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103:211-25.
23. Morrison, D. K., Cutler, R. E. (1997) The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:174-9.
24. Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar-Sagi, D. and Kuriyan, J. (1998) The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* 394: 337-343.
25. van Triest, M., de Rooij, J., Bos J, L. (1997) Measurement of GTP-bound Ras-like GTPases by activation-specific probes. *Methods Enzymol* 333:343-8.
26. de Rooij, J., Bos, J. L. (1997) Minimal Ras-binding domain of Raf1 can be used as an activation-specific probe for Ras. *Oncogene* 14:623-5.
27. Taylor, S. J., Resnick, R. J., Shalloway, D. (2001) Nonradioactive determination of Ras-GTP levels using activated ras interaction assay. *Methods Enzymol* 333:333-42.
28. Kae, H., Kortholt, A., Rehmann, H., Insall, R.H., Van Haastert, P. J., Spiegelman, G. B., Weeks, G. (2007) Cyclic AMP signalling in Dictyostelium: G-proteins activate separate Ras pathways using specific RasGEFs. *EMBO Rep.* 8(5):477-82.
29. Wilkins, A., Chubb, J. R., Insall, R. H. (2000) A novel Dictyostelium RasGEF is required for normal endocytosis, cell motility and multicellular development. *Curr Biol.* 10(22):1427-37.
30. Ura, K., Obama, K., Satoh, S., Sakai, Y., Nakamura, Y., Furukawa, Y. (2006) Enhanced RASGEF1A expression is involved in the growth and migration of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 12:6611-6.
31. Korotayev, K., Chaussepied, M., Ginsberg, D. (2008) ERK activation is regulated by E2F1 and is essential for E2F1-induced S phase entry. *Cell Signal.* 20:1221-6.

32. Shibolet, O., Giallourakis, C., Rosenberg, I., Mueller, T., Xavier, R. J., Podolsky, D. K. (2007) AKAP13, a RhoA GTPase-specific guanine exchange factor, is a novel regulator of TLR2 signaling. *J Biol Chem.* 282(48):35308-17.
33. Kyriakis, J. M., Avruch, J. (1996) Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J. Biol. Chem.* 271:24313-24316
34. Cohen, P. (1997) The search for physiological substrates of mitogen and stress activated protein kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol.* 7:353-361.
35. Campos, M. A. S., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Procópio, D. O., Valente, E., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., Gazzinelli, R. T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167:416-423.
36. Medzhitov, R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135-145
37. Stovall, S. H., Yi, A. K., Meals, E. A., Talati, A. J., Godambe, S. A., English, B. K. (2004) Role of vav1- and src-related tyrosine kinases in macrophage activation by CpG DNA. *J Biol Chem.*279:13809-16
38. Minoprio, P. M., Eisen, H., Forni, L., D'Imperio Lima, M. R., Joskowicz, M. and Coutinho, A. (1986) Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol* 24(6), 661-8.
39. d'Imperio Lima, M. R., Eisen, H., Minoprio, P., Joskowicz, M. and Coutinho, A. (1986) Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol* 137(1), 353-6.
40. Priatel, J. J., Teh, S. J., Dower, N. A., Stone, J. C. and Teh, H. S. (2002) RasGRP1 transduces low-grade TCR signals which are critical for T cell development, homeostasis, and differentiation. *Immunity* 17(5), 617-27.

41. Dower, N. A., Stang, S. L., Bottorff, D. A., Ebinu, J. O., Dickie, P., Ostergaard, H. L. and Stone, J. C. (2000) RasGRP is essential for mouse thymocyte differentiation and TCR signaling. *Nat Immunol* 1(4), 317-21.
42. Norment, A. M., Bogatzki, L. Y., Klinger, M., Ojala, E. W., Bevan, M. J. and Kay, R. J. (2003) Transgenic expression of RasGRP1 induces the maturation of double-negative thymocytes and enhances the production of CD8 single-positive thymocytes. *J Immunol* 170(3), 1141-9.
43. Kumar, A. et al. (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes dev* 16, 707-719.
44. Huh, W. K. et al. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
45. Huber, L. A. (2003) Opinion: is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol. Cell Biol.* 4:74-80.
46. Mattila, P., Korpela, J., Tenkanen, T., Pitkänen, K. (1991) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermococcus litoralis* DNA polymerase--an extremely heat stable enzyme with proofreading activity. *Nucleic Acids Res.* 19:4967-73.
47. Andersson, S., Davis, D. L., Dahlbäck, H., Jörnvall, H., Russell, D. W. (1989) Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J Biol Chem.* 264:8222-9.
48. Southern, P. J., Berg, P. (1982) Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet.* 1:327-41.
49. Li, X., Xue, Z., Zhang, S. (2007) Construction of recombinant plasmid harboring APP717 mutation and preliminary study of APP proteolysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 27:487-90.
50. Fenton, R. A., Brond, L., Nielsen, S., Praetorius, J. (2007) Cellular and subcellular distribution of the type-2 vasopressin receptor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:748-60.

51. Longden, J., Cooke, E. L., Hill, S. J. (2008) Effect of CCR5 receptor antagonists on endocytosis of the human CCR5 receptor in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol.*153: 1513-27.
52. Kain, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W., Kitts, P. (1995) Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *Biotechniques.* 19:650-5.
53. Dai, L. C., Xu, D. Y., Yao, X., Min, L. S., Zhao, N., Xu, B. Y., Xu, Z. P., Lu, Y. L. (2006) Construction of a fusion protein expression vector MK-EGFP and its subcellular localization in different carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol.* 12:7649-53.
54. Bendetz-Nezer, S., Seger, R. (2007) Role of non-phosphorylated activation loop residues in determining ERK2 dephosphorylation, activity, and subcellular localization. *J Biol Chem.* 282:25114-25122.
55. Leonova, T., Grabowski, G. A. (2000) Fate and sorting of acid beta-glucosidase in transgenic mammalian cells. *Mol Genet Metab.* 70:281-94.
56. Arozarena, I., Matallanas, D., Berciano, M. T., Sanz-Moreno, V., Calvo, F., Muñoz, M. T., Egea, G., Lafarga, M., Crespo, P. (2004) Activation of H-Ras in the endoplasmic reticulum by the RasGRF family guanine nucleotide exchange factors. *Mol Cell Biol.* 24(4):1516-30.
57. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., Conklin, D. S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16:948-58.
58. Xianglan, C., Ko, K. M., Singaravelu, G., Ahnn, J. (2008) Novel calcineurin interacting protein-2: the functional characterization of CNP-2 in *Caenorhabditis elegans*. *BMB Rep.* 41:455-60.
59. Wang, F., Chen, L., Mao, Z. B., Shao, J. G., Tan, C., Huang, W. D. (2008) Lentivirus-mediated short hairpin RNA targeting the APRIL gene suppresses the growth of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 20:135-139.
60. Joseph, J., Dasso, M. (2007) The nucleoporin Nup358 associates with and regulates interphase microtubules. *FEBS Lett.* 582:190-196.

61. Sprang, S. R. (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem.* 66:639-678.
62. Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., Cooper, J. A. (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74(1):205-14.
63. Smith, D. B. and Johnson, K. S. (1988) Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene (Amst.)* 67:31-40
64. di Guan, C., Li, P., Riggs, P. D. and Inouye, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene (Amst.)* 67: 21-30
65. Cen, H., Papageorge, A. G., Vass, W. C., Zhang, K. and Lowy, D. R. (1993) Regulated and Constitutive Activity by CDC25^{Mm} (GRF), a Ras-Specific Exchange Factor. *Molecular and Cellular Biology* 13: 7718-7724.
66. Rebhun, J. F., Chen, H. and Quilliam, L. A. (2000) Identification and Characterization of a New family of guanine nucleotide exchange factor for the Ras-related GTPase RAL. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 13406-13410.
67. Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S. and Wigler, M. (1987) The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* 48: 789-799.
68. Miosga, T., Zimmermann, F. K. (1996) Sequence analysis of the CEN12 region of *Saccharomyces cerevisiae* on a 43.7 Kb fragment of chromosome XII including an open reading frame homologous to the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein CFTR. *Yeast*,12: 693-708.
69. Rost, B. et al. (2003). Automatic prediction of protein function. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2637-2650.
70. Pfeffer, S. R. and Rotheman, J.E. (1987) Biosynthetic transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 829-852.

71. Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000). *Lehninger: principles of biochemistry*. 3. ed. New York: Worth Publishers, ISBN: 1-57259-931-6.
72. Guda, C., and Subramaniam, S. (2005) Target: a new method for predicting protein subcellular localization in eukaryotes. *Bioinformatics*. 21: 3963-3969.
73. Höglund, A., Dönnès, P., Blum, T., Adolph, H. W. and Kohlbacher, O. (2006) MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics*. 22: 1158-1165.
74. Berger, T. and Kretzler, M. (2002) Interaction of DAP3 and FADD only after cellular disruption. *Nat. Immunol.* 3: 3-5.
75. Talcott, B., Moore, M. S. (2000) The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin alpha3/Qip. *J. Biol. Chem.* 275:10099-10104.
76. Toenjes, K. A., Sawyer, M. M., Johnson, D. I. (1999) The guanine nucleotide exchange factor CDC42 is targeted to the nucleus and polarized growth sites. *Curr. Biol.* 9:1183-1186.
77. Ishizaki, R., Shin, H. W., Mitsuhashi, H., Nakayama, K. (2008) Redundant Roles of BIG2 and BIG1, Guanine-Nucleotide Exchange Factors for ADP-Ribosylation Factors in Membrane Traffic between the trans-Golgi Network and Endosomes. *Mol Biol Cell*. 19(6):2650-60.
78. Li, B. Q., Wang, M. H., Kung, H. F., Ronsin, C., Breathnach, R., Leonard, E. J., Kamata, T. (1995) Macrophage-stimulating protein activates Ras by both activation and translocation of SOS nucleotide exchange factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 216(1):110-8.
79. Hisata, S., Sakisaka, T., Baba, T., Yamada, T., Aoki, K., Matsuda, M., Takai, Y. (2007) Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth. *J Cell Biol*. 178(5):843-60.
80. Hunker, C. M., Galvis, A., Kruk, I., Giambini, H., Veisaga, M. L., Barbieri, M. A. (2006) Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 340(3):967-75.

81. Feng, Y., Press, B., Wandinger-Ness, A. (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol.*131(6 Pt 1):1435-52.
82. Barbieri, M. A., Hoffenberg, S., Roberts, R., Mukhopadhyay, A., Pomrehn, A., Dickey, B. F., Stahl, P. D. (1998) Evidence for a symmetrical requirement for Rab5-GTP in in vitro endosome-endosome fusion. *J Biol Chem.* 273(40):25850-5
83. Barbieri, M. A., Fernandez-Pol, S., Hunker, C., Horazdovsky, B. H., Stahl, P. D. (2004) Role of rab5 in EGF receptor-mediated signal transduction. *Eur J Cell Biol.* 83(6):305-14.
84. Méresse, S., Gorvel, J. P., Chavrier, P. (1995). The rab7 GTPase resides on a vesicular compartment connected to lysosomes. *J Cell Sci.* 1995 Nov;108 (Pt 11):3349-58.
85. Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., Eskelinen, E. L. (2004) Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 117(Pt 20):4837-48.
86. Yaku, H., Sasaki, T., and Takai, Y. (1994) The Dbl oncogene product as a GDP/GTP exchange protein for the Rho family: its properties compared with those of Smg GDS. *Biochem Biophys Res Commun* 198:811–817.
87. Horiuchi, H., Kawata, M., Katayama, M., Yoshida, Y., Musha, T., Ando, S., and Takai, Y. (1991) A novel prenyltransferase for a small GTP-binding protein having a C-terminal Cys-Ala-Cys structure. *J Biol Chem* 266: 16981–16984.
88. Rebhun, J. F., Castro, A. F., Quilliam, L. A. (2000) Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1 GTPase. Regulation of MR-GEF by M-Ras-GTP interaction. *J Biol Chem.* 275(45):34901-8.
89. Kogut, M. H., Genovese, K. J., He, H. (2007) Flagellin and lipopolysaccharide stimulate the MEK-ERK signaling pathway in chicken heterophils through differential activation of the small GTPases, Ras and Rap1. *Mol Immunol.* 44(7):1729-36
90. Miletic, A. V., Graham, D. B., Montgrain, V., Fujikawa, K., Kloeppe, T., Brim, K., Weaver, B., Schreiber, R., Xavier, R., Swat, W. (2007) Vav proteins control MyD88-dependent oxidative burst. *Blood.* 109(8):3360-8.

91. Hebeis, B., Vigorito, E., Kovcsdi, D., Turner, M. (2005) Vav proteins are required for B-lymphocyte responses to LPS. *Blood* 106(2):635-40
92. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 11(1):115-22.
93. Xu, H., An, H., Yu, Y., Zhang, M., Qi, R., Cao, X. (2003) Ras participates in CpG oligodeoxynucleotide signaling through association with toll-like receptor 9 and promotion of interleukin-1 receptor-associated kinase/tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 complex formation in macrophages. *J Biol Chem*. 278(38):36334-40.
94. Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B G., Knetter, C. F., Lien, E., Nilsen, N. J., Espevik, T., Golenbock, D. T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*. 5(2):190-8.
95. Ahmad-Nejad, P., Häcker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R. M., Wagner, H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol*. 32(7):1958-68.
96. Hammond, S., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404(6775): 293–6.
97. Giraldez, A. J., and Schier, A. F. (2006) MicroRNA function and mechanism: Insights from Zebra fish. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 71: 195-203.
98. Bachellerie, J. P., Cavaille, J. and Huttenhofer, A. (2002) The expanding snoRNA world. *Biochimie* 84: 775–790.
99. Cullen, B. R. (2004) Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res*. 102: 3–9.
100. He, Z. and Sontheimer, E. J. (2004) “siRNAs and miRNAs”: a meeting report on RNA silencing. *RNA* 10: 1165–1173.
101. Lee, R. C., Feinbaum, R., Land Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75(5): 843-854

102. Zeng, Y., Yi, R. and Cullen, B. R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 9779–9784.
103. Yekta, S., Shih, I. H. and Bartel, D. P. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304: 594–596.
104. Gil, J., Esteban, M. (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis*. 5:107-14. Review
105. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
106. Tuschl, T.; Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., Sharp, P. A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13: 3191-7.
107. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Hannon, G. J. (2002) Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 1443-8.
108. Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E., Hannon, G. J., Conklin, D. S. (2002) Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* 16:948-58.
109. Chiu, V. K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J. B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson, R. L. 2nd., Cox, A. D., Philips, M. R. (2002). Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol.* 4(5):343-50

