



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INTERAÇÃO ENTRE IQGAP1 E ACTINA MEDIADO POR Cdc42 E Rac1

Aluno: Rafael Luzes Pereira

Orientador: Luiz Claudio Cameron

UBERLÂNDIA – MG

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INTERAÇÃO ENTRE IQGAP1 E ACTINA MEDIADO POR Cdc42 E Rac1

Aluno: Rafael Luzes Pereira

Orientador: Luiz Claudio Cameron

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA – MG

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P436i Pereira, Rafael Luzes, 1983-
Interação entre IQGAP1 e actina mediado por CDC42 e RAC1
/ Rafael Luzes Pereira. - 2010.
75 f. : il.

Orientador: L. C. Cameron.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

.. Proteínas - Teses. 2. Citoesqueleto - Teses. I. Cameron, L. C. Luis Cláudio) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.112

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU/Setor de Catalogação e Classificação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

INTERAÇÃO ENTRE IQGAP1 E ACTINA MEDIADO POR Cdc42 E Rac1

Aluno: Rafael Luzes Pereira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Claudio Cameron

Examinadores:

Prof. Dr. David William Provance Junior (titular)

Prof. Dr^a. Amélia Hamaguchi (titular)

Prof. Dr^a. Adriana Bassini (suplente)

Prof. Dr. Milton Vieira Coelho (suplente)

Data da Defesa: 19/07/2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação foi contemplada

Prof. Dr. L. C. Cameron

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família, principalmente aos meus pais, Sergio e Rosane, por serem meus exemplos de vida e por confiarem quem todo este trabalho teria um final feliz.

Agradecimentos

A minha família, especialmente minhas avós Edna e Ondina pelo carinho nas horas complicadas e por deixar um suco de maracujá sempre pronto;

Ao Prof. Dr. George Bloom e sua esposa Patricia Bloom por sempre manterem as portas abertas para mim e ter me proporcionado uma experiência de vida incrível, além de me ensinar tudo que sei de inglês;

Ao meu orientador Prof. Dr. L. C. Cameron, que no intervalo entre uma bronca e outra, me mostrou como é difícil fazer ciência em nosso país e por me fazer crescer em intelecto, espírito e como pessoa. Chefe você realmente é um lutador;

Ao Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, pelas ideias e por deixar as portas de seu laboratório sempre abertas para quem estiver disposto a aprender;

Aos professores da pós-graduação que contribuíram com meu desenvolvimento intelectual e ajudaram quando estávamos desesperados com as questões mais simples;

Aos companheiros de Mestrado, por compartilharem os sofrimentos e alegrias nestes 2 anos;

A família LBP, Adriana, Nathy, Anibal, Marcelo “Bomba”, Flavio, Rogério, Sandra, Eduardo, Rose e todos que fizeram parte dessa história;

Ao grande amigo Ricardo de Miranda, por gastar longas horas me ajudando na bancada, na parte burocrática e revendo esta tese;

Aos amigos Horst e Nikki por me acolherem em momentos difíceis e por serem parte de minha família, mesmo tão distante de casa;

Aos companheiros da University of Virginia, especialmente a Eva Kan, Ying Cai, Matthew (Matt) Seward e Xiolan Fang pelo companheirismo e pelas horas de paciência no laboratório;

A Dona Maura que levava o café de manhã e sempre deixava o laboratório pronto para nossas bagunças durante o dia.

A Marcelle Gomes, Dona Dalva, Dona Andrea e Antonia, por facilitarem a vida do meu orientador e deixa-lo com mais tempo para responder as minhas dúvidas;

Aos responsáveis pelo departamento de radiologia do hospital Gaffree e Guinle, por deixarem as portas abertas de seu local de trabalho para nossos experimentos;

A todo o departamento de limpeza e de segurança da UNIRIO, por terem comprado nosso café, carregado nossas caixas, ajudado a organizar nosso laboratório e por nos darem segurança durante as noites de trabalho;

A Albert Lester Lehninger, Harvey Lodish, Arnold Berk, Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Lawrence Zipursky, and James Darnell e ao Google, por terem formado a base do conhecimento científico de muito estudantes.

SUMÁRIO

Apresentação	1
RESUMO.....	3
CAPÍTULO I	4
<i>Fundamentação teórica: interação entre IQGAP1 e actina, mediado por Cdc42 e Rac1</i>	
INTRODUÇÃO	5
CITOESQUELETO	5
Aspectos Gerais.....	5
Filamento de Actina	6
Regulação da dinâmica do filamento de actina e a família IQGAP....	8
IQGAP1.....	10
Cdc42, Rac1 e Rho GTPases.....	13
REFERÊNCIAS.....	14
 CAPÍTULO II	 21
<i>Cai, Y., H. Wallrabe, et al. Modulation of IQGAP1-Stimulated Actin Assembly by Cdc42 and Rac1. 2010.</i>	
 CAPÍTULO III	 39
Resultados complementares	
INTRODUÇÃO	41
MATERIAL E MÉTODOS	42
Reagentes.....	42
Purificação de proteínas	43
Enriquecimento de IQGAP1	43
Polimerização Actina.....	44
PullDown	44
Eletroforese.....	46
Western Blot.....	46
RESULTADOS e DISCUSSÃO	47
Enriquecimento de IQGAP1	47
REFERÊNCIAS.....	60
CONCLUSÃO GERAL.....	61

Lista de Figuras

CAPÍTULO I

Figura 1. Actina monomérica e filamentos.....	7
Figura 2. Família das proteínas IQGAPs.....	9
Figura 3. Modelo representativo de IQGAP 1.....	11
Figura 4. Comparação estrutural entre IQGAP1 e IQGAP2.	11
Figura 5. Processos que envolvem a família das Rho GTPases.....	14

CAPÍTULO II

Figure 1. Rac1, like Cdc42, binds N-WASP and stimulates actin assembly through the Arp2/3 complex.	35
Figure 2. Cdc42 promotes association of N-WASP with IQGAP1, and acts additively with IQGAP1 to stimulate actin assembly	36
Figure 3. Rac1 inhibits association of N-WASP with IQGAP1, and acts bimodally with IQGAP1 to regulate actin assembly.	37
Figure 4. Actin assembly in the presence of constant IQGAP1 and variable Rac1 or Cdc42 is relatively insensitive to the small G protein concentration.	38

CAPÍTULO III

Figura 1. Etapas do enriquecimento de IQGAP1	51
Figura 2. A co-sedimentação de IQGAP1 e actina.....	52
Figura 3. Gradiente não linear de sacarose das amostras eluídas da cromatografia de afinidade, mostrado em SDS-PAGE.	53
Figura 4. Co-sedimentação de IQGAP1 e actina na presença de alta concentração de sal.....	54
Figura 5. A co-sedimentação de IQGAP1 é dependente da concentração de sal.....	55
Figura 6. <i>PullDown</i> entre Rac1 e N-WASP, associados com GTP e GDP.....	58
Figura 7. <i>PullDown</i> entre Cdc42,nativas e recombinantes e N-WASP, associados com GTP ou GDP.	59

Lista de abreviações

ABP: *Actin binding protein* (proteína ligante de actina)

Aip1: *Actin-interacting protein 1* (proteína de interação com actina 1)

Arp2/3: *Actin-Related Proteins* (proteínas relacionadas com a actina)

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BR: *basic region*

BSA: *Bovine serum albumin* (albumina de soro bovino)

Cdc42: pequena GTPase da família Rho

CHD: *Calponin homology domain* (Domínio homólogo para calponina)

Chymostatin: Inibidor de protease

CLIP170: Proteína ligante de microtúbulo

CRIB: Cdc42/Rac-interactive binding (domínio de interação com Cdc24/Rac)

dGAP1: Membro da família IQGAP encontrado em *Dictyostelium discoideum*

Dia1 formin: *Diaphanous-related formin Dia1*

DTT: D-threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol

E-cadherin: Proteína transmembrânica, dependente de Ca⁺

EDTA: Ácido etilenediaminotetracético

EGTA: Ácido etileneglicol-bis (β -aminoetil éter) N, N, N', N'-tetracético

Família Rho: Família das pequenas GTPases: Cdc42, Rac1 e Rho

FRET: *Fluorescence resonance energy transfer* (Transferência Ressonante de Energia de Fluorescência)

FV: *final volume* (volume final)

GAP: *Ras GTPase-activating protein*

GAPA: Membro da família IQGAP encontrado em *Dictyostelium*

GAP-related domain: domínio onde se ligam as GTPases

GFP: Green fluorescent protein (proteína de fluorescência verde)

GRD : *GAP-related domain*

GST: glutathione S-transferase

GTPγS: *Guanosine gamma thio-phosphate*

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

IP'd: *immunoprecipitated* (imunoprecipitação)

IQ: Domínios de ligação com calmodulina

Iqg1/Cyk1: Membro da família IQGAP encontrado em *Saccharomyces cerevisiae*

Iqgap: IQGAP homólogo encontrado em camundongos

IQGAP: Proteína reguladora do filamento de actina, encontrada em humanos

Leupeptin: Inibidor de protease

MAP kinases: *Mitogen-activated protein kinases* (proteínas quinases ativadoras da mitose)

MDCK: *Madin-Darby canine kidney*

N-WASP: Proteína reguladora do filamento de actina

PBS: *Phosphate buffered saline* (Tampão de fosfato)

Pepstatin A: Inibidor de protease

Qbsua: Membro da família IQGAP encontrado em *Encephalitozoon cuniculi*

Rac1: Pequena GTPase da família Rho

Ras GTPase activating protein: Sítio de ligação das pequenas GTPases

Rho: Proteína da família Rho GTPase, envolvidos na formação de *stress fibers*

Rng2: Membro da família IQGAP encontrado em *Schizosaccharomyces pombe*

S100B: *calcium binding protein B* (proteína ligante de cálcio)

Sar1/Gap1: Membro da família IQGAP encontrado em *Schizosaccharomyces pombe*

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

Stress Fibers: Feixes contrateis de actina

TBS: *Tris buffer saline* (Tampão Tris)

TBST: *Tris buffer saline Tween* (Tampão Tris com Tween)

Temed: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

Triton X100: Octylphenoxy polyethoxyethanol

Tween 20: Polyethoxyethanol Sorbian monolaureate

VCA: *C-terminal catalytic domain* (domínio catalítico c-terminal)

WT: *Wild type* (Tipo selvagem)

WW: Domínio rico em prolina

α -catenin: Proteína associada ao filamento de actina, relacionadas com a comunicação intercelular

β -catenin: Proteína associada ao filamento de actina, relacionadas com migração celular

Apresentação

Esta Dissertação de mestrado foi elaborada em capítulos três capítulos, de acordo com as normas vigentes do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da UFU, sendo o primeiro uma revisão bibliográfica do tema abordado, o segundo é o artigo elaborado durante os 2 anos de mestrado e o terceiro um capítulo de resultados complementares.

Nos últimos anos, nosso laboratório estabeleceu uma importante colaboração com o laboratório do professor George Bloom, na University of Virginia. Durante este tempo o professor Cameron foi convidado diversas vezes para desenvolver experimentos e colaborar em projetos que já estão em desenvolvimento no laboratório do professor Bloom.

Em Dezembro de 2006, fui convidado pelo professor Cameron e pelo professor Bloom a visitar esta universidade e desenvolver meu projeto de pesquisa parte nos Estados Unidos e parte no Brasil. Desde essa data, já passei cerca de dois anos na University of Virginia desenvolvendo os experimentos referentes a meu projeto de Mestrado.

Desde que iniciamos esta colaboração, nosso laboratório vem se dedicando a pesquisa da dinâmica de citoesqueleto, mais especificamente sobre a dinâmica do filamento de actina mediada pela família IQGAP e pequenas GTPases. Entre outros resultados, desenvolvemos um método de purificação de IQGAP1 nativo, onde observamos a forte ligação entre IQGAP1 e actina, que embora seja resistente a vários procedimentos de dissociação, mostrou-se sensível a concentração de NaCl presente no meio.

A regulação do filamento de actina feita por IQGAP1 é diretamente relacionada a presença de outras proteínas, principalmente da família Rho GTPases, com CDC42, Rac1 e RhoA. Estas proteínas têm função fundamentais em vários mecanismos essenciais para a sobrevivência da célula, como recrutamento de actina G para formação de filamentos, reorganização dos filamentos para formação de pseudópodes, interação celular, entre outras funções.

IQGAP1 age ligando-se a actina, por meio de seu sítio CHD, e as pequenas GTPases ligam-se no domínio GRD, desta forma alterando a dinâmica do filamento de actina, podendo estimular ou deprimir a polimerização deste filamento.

No capítulo 1 trouxemos a fundamentação teórica deste trabalho, fazendo uma breve revisão sobre a dinâmica do citoesqueleto, com foco no filamento de actina e suas interações com as proteínas da família IQGAP e as pequenas GTPases da família Rho. Falamos da regulação feita por essas proteínas e os mecanismos em que elas estão envolvidas e como suas deficiências podem gerar doenças associadas a dinâmica inadequada do citoesqueleto.

O capítulo 2 tem como finalidade mostrar como a interação entre IQGAP1 e Cdc42 ou Rac1, mediado por GDP ou GTP, influencia na dinâmica do filamento de actina.

No capítulo 3 mostramos o processo de purificação de IQGAP1 nativo e a forte ligação que esta proteína estabelece com actina.

RESUMO

O citoesqueleto é um componente vital, tendo algumas funções básicas para o funcionamento normal e a manutenção das atividades celulares, como a emissão de pseudópodes, o transporte de vesículas e de outros componentes, a migração, entre outros. Estão envolvidos nesses processos microtúbulos, filamentos de actina, filamentos intermediários e várias proteínas associadas.

Dentre essas proteínas, podemos citar as pertencentes à família IQGAP. Elas são proteínas reguladoras da dinâmica de actina, mediadas por GTP e GDP. Três delas estão presentes em humanos, IQGAP1, IQGAP2 e IQGAP3. Essas proteínas são muito similares entre si e têm seus domínios e sequências primárias muito conservadas. A regulação e interações destas proteínas, com actina e pequenas GTPases também são descritas de maneira muito similar.

A interação das proteínas IQGAPs com Cdc42, Rac1 e Rho é muito importante na regulação da dinâmica do filamento de actina, podendo acelerar a polimerização ou deprimir, dependendo da interação especificada. Podemos ver como elas estimulam a polimerização de actina, sozinhas ou na presença de IQGAP1.

O processo de purificação de IQGAP1 nativo, de rins bovinos, foi elaborado para melhor observar a dinâmica desta proteína. Embora a ligação entre IQGAP1 e actina tenha se mostrado muito forte e resistente a diversos processos de dissociação, mostrou-se sensível à concentração de NaCl.

Dentro deste trabalho nosso principal objetivo foi estudar a influência que a interação entre Rac1 e Cdc42 com IQGAP1 exercem na dinâmica do filamento de actina e, mais especificamente, avaliar a influência, no filamento de actina, das interações entre IQGAP1 e Rac1 e IQGAP1 e Cdc42, comparativamente, além de desenvolver um método de purificação de IQGAP1 nativo.

Palavras Chave: IQGAP1, actina, Rac1, Cdc42

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

INTERAÇÃO ENTRE IQGAP1 E ACTINA, MEDIADO POR Cdc42 E Rac1

INTRODUÇÃO

CITOESQUELETO

Aspectos Gerais

A determinação da forma, sinalização, adesão, migração, transporte pela membrana e muitos outros eventos celulares são baseados na dinâmica do citoesqueleto.

O citoesqueleto é formado basicamente por três tipos de filamentos: 1) os filamentos de actina (~6 nm de diâmetro), composto por polímeros de actina-G; 2) os microtúbulos (~25 nm de diâmetro), que são polímeros de α - e β -tubulina e 3) os filamentos intermediários (~10 nm de diâmetro), sendo estes compostos por uma estrutura de monômeros proteicos, como queratinas, vimentinas, laminas, nestinas, entre outros (Oshima, 2007). Juntos, estes elementos individuais criam uma rede integrada composta por inúmeros subdomínios.

O citoesqueleto não está limitado a funções estruturais. Outras proteínas se associam a esta rede e são importantes para a diversificação e especificidade de suas funções. Proteínas reguladoras da polimerização e da despolimerização dos filamentos e os motores moleculares (MM) interagem com o citoesqueleto conferindo-lhe funções dinâmicas e importância em diversos processos celulares (Vicente-Manzanares et al., 2005). Os MM são uma classe especial de enzimas que utilizam a energia proveniente da hidrólise de ATP para deslizar ao longo dos filamentos de actina ou microtúbulo, sendo responsáveis pelo deslocamento celular e transporte de partículas no interior da célula (Takaine et al., 2009).

Existem diferentes MM para distintos filamentos presente no citoesqueleto. Aos microtúbulos associam-se duas famílias de MM: as cinesinas e as dineínas. Os membros da família das cinesinas têm sua estrutura diversificada, estão envolvidos no transporte de organelas, partindo da extremidade negativa do microtúbulo em direção a extremidade positiva (Akhmanova & Hammer III, 2010), e estão diretamente ligadas ao processo de divisão celular (Akhmanova & Hammer, 2010). As dineínas participam de funções semelhantes e também estão envolvidas na estrutura de cílios e flagelos (Hendricks et al., 2010), embora sua

orientação seja contrária, partindo da extremidade positiva e indo em direção a extremidade negativa do microtúbulo. Aos filamentos de actina associam-se as miosinas (Espreafico et al., 1992).

Filamento de Actina

Actina é uma proteína abundante e conservada durante a evolução nas células eucariontes e essencial para a formação de várias estruturas celulares como lamelopodia, filopodia, *stress fibers*, entre outras (Bailly & Condeelis, 2002). Actina existe em duas formas monomérica (G-actina) e polimerizada (F-actina) (figura 1C), formando filamentos lineares e assimétricos que polimerizam e despolimerizam, dependendo da polaridade dos monômeros, partindo de suas extremidades, desta forma causando importantes mudanças na estrutura e na estabilidade do filamento (Pollard et al., 2000). Actina possui um mecanismo de auto regulação de sua polimerização, isto se deve ao fato desta proteína ser uma ATPase e de hidrolisar nucleotídeos durante a transição de F-actina para G-actina (Fig 1A). A presença de ATP é fundamental para a interação entre os monômeros (G-actina) e a formação do filamento (F-actina), esta polimerização acontece do lado positivo (+) do filamento. Na presença de ADP, ocorre a despolimerização da F-actina partindo da extremidade negativa (-) do filamento (figura 1B). O aparecimento de Pi é consequência da hidrólise de ATP (figura 1A).

O equilíbrio entre essas duas formas de actina depende de diferentes fatores, principalmente da regulação por proteínas que se ligam a F-actina. Estas proteínas executam muitas funções associadas a dinâmica do filamento de actina, como alongamento, nivelamento, interligação entre diferentes filamentos e recrutamento de actina-G (Pollard & Borisy, 2003).

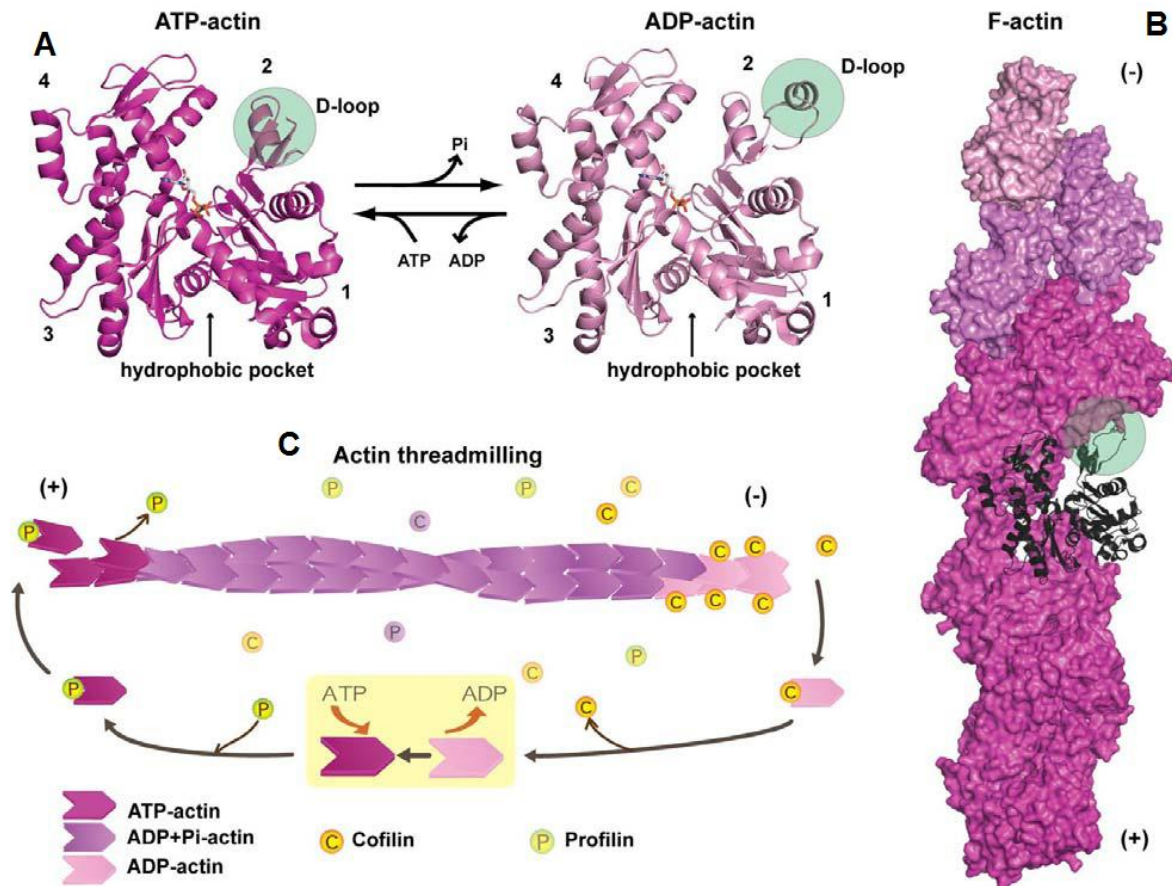


Figura 1. Actina monomérica e filamentos. (A) Monômero de actina consiste em dois domínios principais, estes, por sua vez, se dividem em quatro subdomínios: os internos 1 e 2 e os externos 3 e 4. A combinação entre esses quatro subdomínios forma duas aberturas, sendo a maior delas localizada entre os subdomínios 2 e 4. Nesta abertura está o sítio de ligação dos nucleotídeos. Na outra fissura está o local onde as ABPs fazem a ligação. As mudanças conformacionais de actina dependem da ligação com ATP e a consequente sinalização para as ABPs. (B) Modelo estrutural de filamento de actina (actina-F), mostrando a orientação do filamento e a organização entre a estrutura dos monômeros (Oda et al., 2009). (C) Modelo em dupla hélice do filamento de actina. A extremidade positiva (+) expõe os subdomínios 2 e 3 e é caracterizada pela incorporação de novos monômeros de actina na presença de ATP. Na extremidade negativa (-), ficam expostos os subdomínios 2 e 4. Esta extremidade é caracterizada pela despolimerização do filamento na presença de ADP. In vivo, a regulação da dinâmica do filamento de actina é mediada pelas ABPs. Desta maneira, os fatores de despolimerização de actina/Cofilina aceleram a dissociação dos monômeros na parte negativa, enquanto que a profilina acelera a polimerização, promovendo a incorporação de ATP aos monômeros. (modificado de Lee & Dominguez, 2010)

Quanto mais complexo é o organismo, é necessária uma maior organização para regular esse mecanismo. Alterações na regulação desse filamento e das proteínas relacionadas a ele podem causar (ou ser cofator) de muitas doenças, como câncer, desordens neurológicas, cardiomiopatias, síndrome de Wiskott-Aldrich entre outras (Kuroda et al., 1996).

Regulação da dinâmica do filamento de actina e a família IQGAP.

Entre as principais proteínas que fazem a regulação desse filamento, podemos citar as pequenas GTPases pertencentes a família Rho, Cdc42, Rac1 e Rho, controlando, respectivamente, a formação de filopódia, lamelopódia e *stress fibers* (Kuroda et al., 1996; Fukata et al., 1997). Outro importante grupo de proteínas regulatórias são as IQGAPs, que regulam indiretamente a polimerização do citoesqueleto de actina.

IQGAPs são proteínas encontradas em células eucariontes, ligantes de actina e de fatores que sinalizam para a polimerização do filamento de actina. A proteína foi assim denominada devido a presença em sua estrutura de um domínio IQ (postulados como domínios de ligação com calmodulina) e um domínio Ras GTPase-activating protein (GAP), onde se ligam GTPases (Hart et al., 1996; Joyal et al., 1997).

Até o momento foram identificados três membros desta família, as proteínas IQGAP1, IQGAP2 e IQGAP3. Embora com diferenças estruturais, as sequências de aminoácidos das IQGAPs são similares e bem conservadas sugerindo que essas proteínas desempenham funções similares (Epp & Chant, 1997; Venturelli et al., 2000). Homólogos dessas proteínas foram encontrados em diferentes organismos desde leveduras até humanos (figura 2).

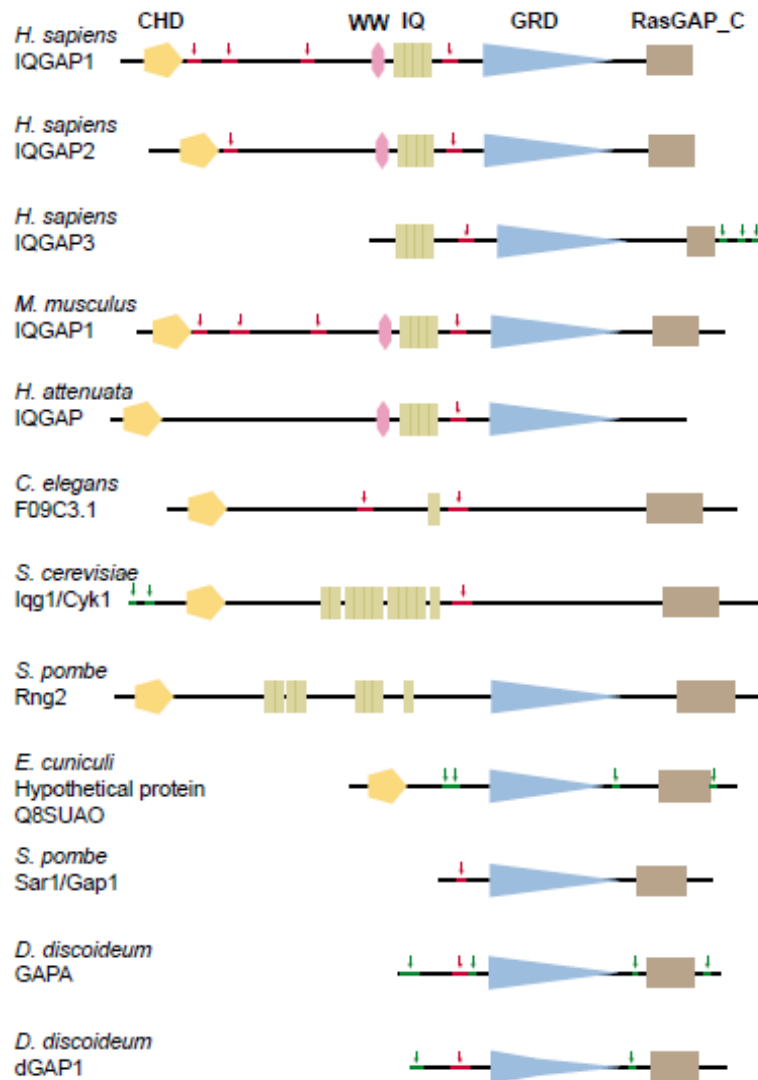


Figura 2. Família das proteínas IQGAPs. Modelos representativos de algumas proteínas da família IQGAP, proveniente de diferentes organismos. Nas linhas vermelhas estão representadas as possíveis coiled coils e nas linhas verdes estão representadas as estruturas de baixa complexidade estrutural. Nestes modelos também há os domínios encontrados nos homólogos de diferentes espécies, como: CHD, calponin homology domain (domínio homólogo a calponina); WW, poly-proline-binding domain (domínio rico em prolina); IQ, calmodulin-binding motif (sítio de ligação de calmodulina); GRD, Ras GTPase-activating protein (GAP)-related domain (domínio responsável pela ligação das GTPases); RasGAP_C, sequência carboxiterminal encontrada nas proteínas da família IQGAP (modificado de Briggs & Sacks, 2003).

Como os membros desta família de proteínas têm suas funções e estruturas muito similares, acredita-se que eles fazem parte de um importante complexo de regulação envolvendo todos os filamentos do citoesqueleto. Muitos membros desta família ainda não foram completamente descritos ou isolados. Os membros já descritos seu em sequenciamento primário grande similaridade entre elas, sugerindo que as funções executadas pelos IQGAPs são essenciais da célula (Briggs & Sacks, 1993).

IQGAP1

É uma proteína de 189 kDa, encontrada em mamíferos, sendo o membro da família IQGAP melhor caracterizado, tendo seus domínios caracterizados e interações, com citoesqueleto, bem descritas. A partir do lado amino-terminal (N-terminal), IQGAP1 liga-se a actina usando o *calponin homology domain* (CHD) (Erickson et al., 1997). O domínio WW é um domínio rico em prolina (Macias et al., 2002). No domínio IQ se ligam calmodulina ou cadeias leves de miosinas e no domínio *Ras GTPase-activating protein* (GAP) aonde se ligam as Rho GTPases: Cdc42 e Rac1. Este domínio também é denominado de *GAP-related domain* (GRD) (Hart et al., 1996; Joyal et al., 1997). Por meio do domínio RasGAP, a IQGAP1 interage com proteínas ligadoras de microtúbulo como a CLIP170, a β -catenin e a *E-cadherin* (Fukata et al., 2002; Briggs et al., 2002; Li et al., 1999) (figura 3). Muitos desses domínios são encontrados em IQGAP2 (figura 4) e IQGAP3 ou em proteínas homólogas. Por exemplo a IQGAP1 encontrada em humanos é 94% homóloga a *iqgap1* encontrado em camundongos. As IQGAP1 e IQGAP2 em humanos têm 62% de homologia. Em leveduras alguns homólogos de IQGAP1 estão presentes no processo de recrutamento de filamentos de actina. Em mamíferos, em experimentos *in vitro* foi observado que a IQGAP1 estimula a polimerização de actina (Fukata et al., 1997), esta função preservada em diferentes organismos parece ser a sua principal função. Além desta interação direta com actina, a IQGAP1 também modula dinâmica do filamento de forma indireta. As Rho GTPases interagem com a proteína por meio de seu domínio GAP, regulando negativamente a polimerização, de forma similar a inibição por Cdc42 observada *in vitro* (Kuroda et al., 1996). Em experimentos em

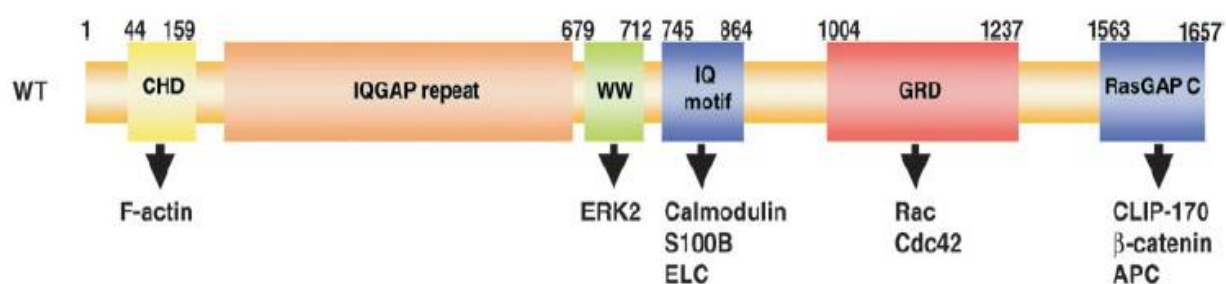


Figura 3. Modelo representativo de IQGAP 1. Os números indicam a posição dos aminoácidos. As proteínas que interagem com IQGAP1 estão indicadas logo abaixo de seus respectivos sítios de ligação (modificado de Noritake et al., 2005)

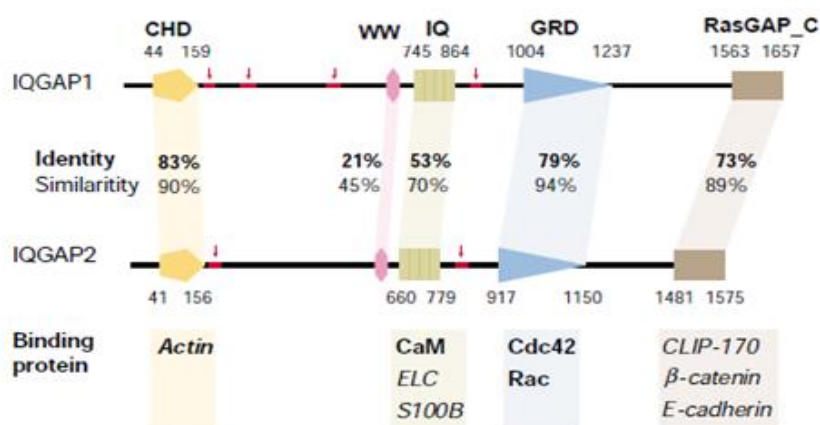


Figura 4. Comparação estrutural entre IQGAP1 e IQGAP2. Modelo representativo de IQGAP1 e IQGAP2, presentes em humanos, mostrando como essas duas proteínas são similares ou idênticas, com base na sequência de aminoácidos delas (obtidos por BLAST). O domínio WW compreende os aminoácidos 679–712 e 594–627 para IQGAP1 e IQGAP2, respectivamente. A similaridade entre os domínios respectivos de cada proteína estão indicadas abaixo de cada sítio. Aquelas destacadas em **negrito** ligam-se apenas em IQGAP1 e as mostradas em *itálico* ligam-se em IQGAP2 (modificado de Briggs & Sacks, 2003).

células vivas, a IQGAP1 estimulou a formação de filopódios por meio do aumento da atividade de Cdc42. Já em experimentos feito com IQGAP1 mutantes que perderam a sinalização de Cdc42, houve diminuição da dinâmica do citoesqueleto (Swart-Mataraza et al., 2002).

A interação de IQGAP1 com microtúbulo não esta muito bem descrita, embora haja descrições que isto ocorra. Experimentos *in vitro* demonstraram a ligação por meio de seu domínio GRD entre IQGAP1 e CLIP170. A CLIP170 é uma proteína ligante de microtúbulo necessária para sinalizar o direcionamento desses filamentos para determinadas regiões corticais. Estas interações sugerem que IQGAP1 está envolvida na dinâmica entre actina e microtúbulo (Gundersen, 2002).

A interação de IQGAP1 com Ca^{+2} /calmodulina também influencia em alguns mecanismos intrínsecos da célula. Na presença de Ca^{+2} , a calmodulina previne a estabilização da IQGAP1 por CDC42, promovendo a polimerização de actina *in vitro* (Mateer et al., 2002). Além disso, o aumento da concentração de Ca^{+2} aumenta a afinidade de calmodulina por IQGAP1. Assim é demonstrado que a IQGAP1 sofre regulação direta de Ca^{+2} /calmodulina (Hart et al., 1996; Joyal et al., 1997; Li & Stuenkel, 2004)

Muitas vezes IQGAP1 é relacionado à carcinogênese. Como exemplo pode-se citar sua interação com E-caderina, que é regulada negativamente em tumores (Bracke et al., 1996), ademais as Rho GTPases são proteínas importantes na dinâmica morfológica de células epiteliais e podem promover a divisão celular. Além disso, podem promover a formação de alguns tipos de tumores malignos.

A superexpressão de IQGAP1 está diretamente relacionada ao câncer gástrico (Morris et al., 2005). Uma provável explicação para isso é a translocação de IQGAP1 do citoplasma para a membrana, inibindo a ação da E-caderina na mediação da ligação intercelular (Fukata et al., 1997). A expressão aumentada de IQGAP1 é encontrada em diversos tipos de câncer, como câncer do colo-retal (Hayashi et al., 2009), de ovário e glioblastomas (Balenci et al., 2006). Assim, células cancerígenas tornaram-se um ótimo modelo para estudar a dinâmica de

IQGAP1 e suas interações com calmodulina, E-caderina e outras proteínas envolvidas na carcinogênese (Joyal et al., 1997; Jadeski et al., 2008; Li et al., 1999).

Cdc42, Rac1 e Rho GTPases

Estas proteínas fazem parte da família Rho GTPase descritas como reguladores da dinâmica da actina. Os três membros mais conhecidos desta família são a Cdc42, Rac1 e Rho, responsáveis pelo controle da regulação do citoesqueleto (Kozma et al., 1995; Chant & Stowers, 1995) (figura 5). A Rac1 e a Rho estimulam a formação de lamelopódia e de *stress fibers* (Ridley et al., 1992), respectivamente. Já a Cdc42 promove a formação de filopódia de forma dependente de GTP (Kozma et al., 1995; Nobes & Hall, 1995). Estas três GTPases, quando ativadas, desencadeiam uma cascata de reações coordenadas. Experimentos feitos *in vivo* sugerem que a ativação de Cdc42 estimula a ativação de Rac1 e que, por sua vez, promove a ativação de Rho (Kozma et al., 1995; Nobes & Hall, 1995). Dentro desta cascata de ativações, os primeiros efeitos são a ativação de Cdc42 induzindo a formação de filopódia. Já os efeitos secundários e terciários incluem a mediação de Rac1 na dinâmica da membrana plasmática e a formação de *stress fiber* mediados por Rho.

O complexo protéico formado pelas pequenas GTPases e IQGAP1 é um potente regulador da dinâmica celular e seu desequilíbrio pode provocar o surgimento de tumores malignos ou benígnos (Balenci et al., 2006). Essas proteínas, ao interagirem com IQGAP1, promovem a alteração da dinâmica do citoesqueleto de actina afetando algumas atividades celulares como a comunicação intercelular, migração, formação de flagelos, entre outras. Em tumores, é muito comum identificar a presença de Rac1/Cdc42/IQGAP1, promovendo a translocação de α -catenin da membrana para o citoplasma e a progressão na formação de tumores (Noritake et al., 2005; Clark et al., 2000).

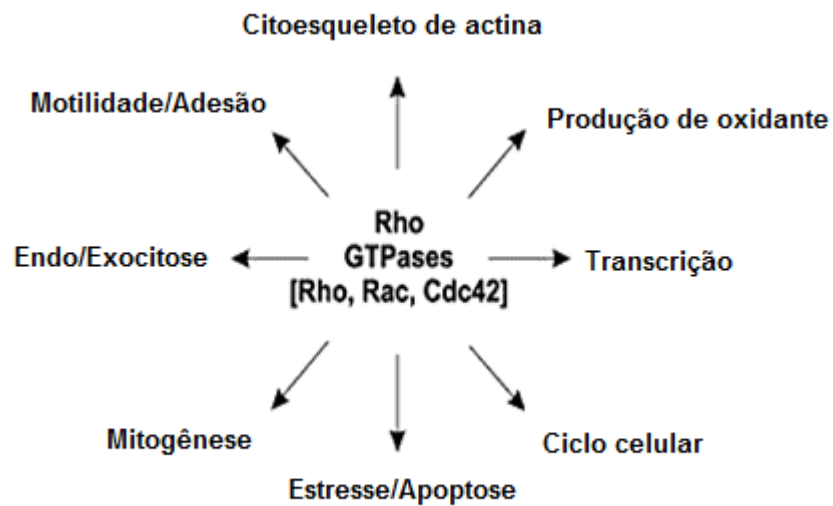


Figura 5. Processos que envolvem a família das Rho GTPases. As pequenas GTPases da família Rho regulam diversas funções celulares. Enfocando Rac1, Cdc42 e Rho, podemos citar vários processos celulares regulados por essas proteínas, que são de extrema importância para as atividades celulares (modificado de Hall, 2005).

Referencias

Akhmanova, A. e J. A. Hammer, 3rd. Linking molecular motors to membrane cargo. Curr Opin Cell Biol, May 11. 2010.

Bailly, M. e Condeelis, J. Cell motility: insights from the backstage. Nat Cell Biol, v.4, n.12, Dec, p.E292-4. 2002.

Balenci, L., Clarke, I. D., et al. IQGAP1 protein specifies amplifying cancer cells in glioblastoma multiforme. Cancer Res, v.66, n.18, Sep 15, p.9074-82. 2006.

Bashour, A. M., Fullerton, A. T., et al. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. J Cell Biol, v.137, n.7, Jun 30, p.1555-66. 1997.

Bensenor, L. B., Kan, H. M., et al. IQGAP1 regulates cell motility by linking growth factor signaling to actin assembly. J Cell Sci, v.120, n.4, Feb 15, p.658-69. 2007.

Bracke, M. E., Van Roy, F. M. et al. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. Curr Top Microbiol Immunol, v.213 (Pt 1), p.123-61. 1996.

Briggs, M. W. e Sacks, D. B. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. EMBO Rep, v.4, n.6, Jun, p.571-4. 2003.

Bugyi, B. e Carlier, M. F. Control of actin filament treadmilling in cell motility. Annu Rev Biophys, v.39, Jun 9, p.449-70. 2010.

Carlsson, A. E. Actin dynamics: from nanoscale to microscale. Annu Rev Biophys, v.39, Jun 9, p.91-110. 2010.

Chant, J. e Stowers, L. GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. Cell, v.81, n.1, Apr 7, p.1-4. 1995.

Clark, E. A., Golub, T. R., et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. Nature, v.406, n.6795, Aug 3, p.532-5. 2000.

Epp, J. A. e Chant, J. An IQGAP-related protein controls actin-ring formation and cytokinesis in yeast. Curr Biol, v.7, n.12, Dec 1, p.921-9. 1997.

Erickson, J. W., Cerione, R. A., et al. Identification of an actin cytoskeletal complex that includes IQGAP and the Cdc42 GTPase. J Biol Chem, v.272, n.39, Sep 26, p.24443-7. 1997.

Espreafico, E. M., Cheney, R. E., et al. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. J Cell Biol, v.119, n.6, Dec, p.1541-57. 1992.

Fukata, M., Kuroda, S., et al. Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. J Biol Chem, v.272, n.47, Nov 21, p.29579-83. 1997.

Fukata, M., Watanabe, T., et al. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. Cell, v.109, n.7, Jun 28, p.873-85. 2002.

Gundersen, G. G. Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol, v.3, n.4, Apr, p.296-304. 2002.

Hall, A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. Biochem Soc Trans, v.33, n.Pt 5, Nov, p.891-5. 2005.

Hart, M. J., Callow, M. G., et al. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. EMBO J, v.15, n.12, Jun 17, p.2997-3005. 1996.

Hayashi, H., Nabeshima, K., et al. Overexpression of IQGAP1 in advanced colorectal cancer correlates with poor prognosis-critical role in tumor invasion. Int J Cancer, v.126, n.11, Jun 1, p.2563-74. 2010.

Hayashi, A., Nishida Y., et al. Immunotherapy of ovarian cancer with cell wall skeleton of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin: effect of lymphadenectomy. Cancer Sci, v.100, n.10, Oct, p.1991-5. 2009.

Hendricks, A. G., Perlson, E., et al. Motor Coordination via a Tug-of-War Mechanism Drives Bidirectional Vesicle Transport. Curr Biol, Apr 14. 2010.

Hotulainen, P. e Lappalainen. P., Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. J Cell Biol, v.173, n.3, May 8, p.383-94. 2006.

Jadeski, L., Mataraza, J. M., et al. IQGAP1 stimulates proliferation and enhances tumorigenesis of human breast epithelial cells. J Biol Chem, v.283, n.2, Jan 11, p.1008-17. 2008.

Joyal, J. L., Annan, R. S., et al. Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. Identification of IQGAP1 by nanoelectrospray tandem mass spectrometry. J Biol Chem, v.272, n.24, Jun 13, p.15419-25. 1997.

Kozma, R., Ahmed, S., et al. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. Mol Cell Biol, v.15, n.4, Apr, p.1942-52. 1995.

Kuroda, S., Fukata, M., et al. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. J Biol Chem, v.271, n.38, Sep 20, p.23363-7. 1996.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Le Clainche, C., Schlaepfer, D., et al. IQGAP1 stimulates actin assembly through the N-WASP-Arp2/3 pathway. J Biol Chem, v.282, n.1, Jan 5, p.426-35. 2007.

Lee, S. H. e Dominguez, R. Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. Mol Cells, v.29, n.4, Apr, p.311-25. 2010.

Li, Q. e Stuenkel, E. L. Calcium negatively modulates calmodulin interaction with IQGAP1. Biochem Biophys Res Commun, v.317, n.3, May 7, p.787-95. 2004.

Li, Z., Kim, S. H., et al. IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function. J Biol Chem, v.274, n.53, Dec 31, p.37885-92. 1999.

Mateer, S. C., Mcdaniel, A. E., et al. The mechanism for regulation of the F-actin binding activity of IQGAP1 by calcium/calmodulin. J Biol Chem, v.277, n.14, Apr 5, p.12324-33. 2002.

Morris, L. E., Bloom, G. S., et al. Nucleotide variants within the IQGAP1 gene in diffuse-type gastric cancers. Genes Chromosomes Cancer, v.42, n.3, Mar, p.280-6. 2005.

Nieset, J. E., Redfield, A. R., et al. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. J Cell Sci, v.110 (Pt 8), Apr, p.1013-22. 1997.

Nobes, C. D. e Hall, A., Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell, v.81, n.1, Apr 7, p.53-62. 1995.

Noritake, J., Watanabe, T., et al. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. J Cell Sci, v.118, n.Pt 10, May 15, p.2085-92. 2005.

Oda, T., Iwasa, M., et al. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. Nature, v.457, n.7228, Jan 22, p.441-5. 2009.

Oshima, R. G. Intermediate filaments: a historical perspective. Exp Cell Res, v.313, n.10, Jun 10, p.1981-94. 2007.

Pollard, T. D., Blanchoin, L., et al. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Annu Rev Biophys Biomol Struct, v.29, p.545-76. 2000.

Pollard, T. D. e Borisy. G. G., Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell, v.112, n.4, Feb 21, p.453-65. 2003.

Rice, S., Lin, A. W., et al. A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. Nature, v.402, n.6763, Dec 16, p.778-84. 1999.

Ridley, A. J. The GTP-binding protein Rho. Int J Biochem Cell Biol, v.29, n.11, Nov, p.1225-9. 1997.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., et al. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. Cell, v.70, n.3, Aug 7, p.401-10. 1992.

Swart-Mataraza, J. M., Li, Z. et al. IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton. J Biol Chem, v.277, n.27, Jul 5, p.24753-63. 2002.

Sweeney, H. L. e Houdusse, A. Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. Annu Rev Biophys, v.39, Jun 9, p.539-57. 2010.

Takaine, M., Numata, O., et al. Fission yeast IQGAP arranges actin filaments into the cytokinetic contractile ring. EMBO J, v.28, n.20, Oct 21, p.3117-31. 2009.

Towbin, H., Staehelin, T., et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, Sep, p.4350-4. 1979.

Venturelli, C. R., Kuznetsov, S., et al. An IQGAP-related gene is activated during tentacle formation in the simple metazoan Hydra. Dev Genes Evol, v.210, n.8-9, Sep, p.458-63. 2000.

Vicente-Manzanares, M., Webb, D. J., et al. Cell migration at a glance. J Cell Sci, v.118, n.Pt 21, Nov 1, p.4917-9. 2005.

Yamashiro, S., Noguchi, T., et al. Localization of two IQGAPs in cultured cells and early embryos of *Xenopus laevis*. Cell Motil Cytoskeleton, v.55, n.1, May, p.36-50. 2003.

CAPÍTULO II

MODULATION OF IQGAP1-STIMULATED ACTIN ASSEMBLY BY Cdc42 AND Rac1

Modulation of IQGAP1-Stimulated Actin Assembly by Cdc42 and Rac1

Ying Cai¹, Horst Wallrabe¹, R. Luzes^{3,4}, Ho-Man Kan¹, L. C. Cameron^{3,4} and George S. Bloom^{1,2,#}

¹Department of Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA

²Department of Cell Biology, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA

³Laboratorio de Bioquímica de Proteínas, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

⁴Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

[#]Author for correspondance (gsb4g@virginia.edu)

Short title: IQGAP1, Rho GTPases and Actin Assembly

Key words: IQGAP1, Cdc42, Rac1, actin, FRET

Summary

IQGAP1 stimulates branched actin filament nucleation by activating N-WASP, which in turn activates the Arp2/3 complex. N-WASP can be activated by other factors, including GTP-bound forms of Cdc42 and Rac1, which also bind IQGAP1. We report here the use of purified proteins for *in vitro* binding and actin polymerization assays, and of fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy of cultured cells to illuminate functional interactions involving IQGAP1, N-WASP, and either Cdc42 or Rac1. In pyrene-actin assembly assays in the presence of N-WASP and the Arp2/3 complex, Cdc42 and IQGAP1 cooperatively stimulated actin filament nucleation, primarily by reducing the lag time before assembly $V_{\max}$ was reached. Cooperativity reflected dose-dependent stimulation by Cdc42 of IQGAP1 binding to N-WASP. Rac1 and IQGAP1 behaved differently. At low Rac1, the two proteins cooperatively reduced the lag time before assembly $V_{\max}$ was reached, but at high Rac1 $V_{\max}$ was faster and reached more quickly for Rac1 alone than for either IQGAP1 alone, or the combination of Rac1 and IQGAP1. This negative cooperativity reflected dose-dependent inhibition by Rac1 of IQGAP1 binding to N-WASP. These results suggest that IQGAP1 interacts by distinct mechanisms with Cdc42 versus Rac1 to regulate actin filament assembly through N-WASP *in vivo*. To address this possibility, FRET microscopy was used to study interactions of GFP-IQGAP1 with mOrange-Cdc42 versus mOrange-Rac1 in live MDCK cells. Robust FRET was observed for both donor/acceptor pairs at F-actin rich cell-cell margins, but the average intermolecular FRET distances closer for IQGAP1-Cdc42 than for IQGAP1-Rac1. The distinct interactions of IQGAP1 with Cdc42 versus Rac1 observed *in vitro* were thus recapitulated in live cells.

Introduction

The IQGAP proteins are broadly represented among eukaryotic species ranging from unicellular organisms to humans, and are defined by a common, minimal set of features. All IQGAPs contain a RasGAP-related C-terminal region, but apparently do not have GAP activity, and function in cellular processes that require actin filaments (Briggs and Sacks, 2003; Mateer and Bloom, 2003). Vertebrates express three such proteins, IQGAP1 (Weissbach et al., 1994), IQGAP2 (Brill et al., 1996) and IQGAP3 (Wang et al., 2007), which share a uniform domain organization and are ~60-70% identical to each other in primary sequence. In addition to the signature domains of all IQGAPs, the vertebrate members of this family contain a variety of domains that have been functionally characterized, primarily for IQGAP1. These include, but are not limited to, an N-terminal calponin homology domain (CHD), a series of tandem α -helical coiled coil repeats for homodimerization, multiple IQ motifs that bind calmodulin or related calcium binding EF hand proteins, binding sites for MAP kinases, cell adhesion molecules, microtubule plus end tracking proteins, N-WASP, the Dia1 formin, growth factor receptors and the exocyst-septin complex, and a GAP-related domain, or GRD, which is necessary, but not sufficient for binding activated forms of the small G proteins, Cdc42 and Rac1 (Bashour et al., 1997; Benseñor et al., 2007; Brandt et al., 2007; Fukata et al., 2002; Hart et al., 1996; Joyal et al., 1997; Kuroda et al., 1996; Kuroda et al., 1998; Le Clainche et al., 2007; Mateer et al., 2002; Mateer et al., 2004; McCallum et al., 1996; Rittmeyer et al., 2008; Roy et al., 2004; Roy et al., 2005; Sakurai-Yageta et al., 2008; Watanabe et al., 2004; Weissbach et al., 1998; Yamaoka-Tojo et al., 2004). This structural richness of IQGAP1 underlies its roles as a scaffolding protein that couples extracellular signals to regulation of cellular motility, morphogenesis and adhesion via control of secretion and actin assembly.

IQGAP1 regulates actin assembly through alternate pathways that respectively require either the Dia1 formin (Brandt et al., 2007) or the Arp2/3 complex (Benseñor et al., 2007; Le Clainche et al., 2007). In the latter case,

IQGAP1 binds directly to N-WASP and activates the latter for binding and activation of the Arp2/3 complex, which then nucleates new actin filaments off of the sides of pre-existing filaments. This process is initiated upstream by direct binding of IQGAP1 to ligand-activated growth factor receptors, which causes branched actin filament networks to be assembled in the immediate vicinity of activated receptors (Benseñor et al., 2007; Yamaoka-Tojo et al., 2004). Growth of these filament networks provides the force for plasma membrane protrusion during cell motility and morphogenesis, which also requires IQGAP1-dependent secretion of new membrane into the expanding region of the cell surface (Rittmeyer et al., 2008; Sakurai-Yageta et al., 2008). Superimposed on the ability of IQGAP1 to stimulate branched actin filament nucleation is its ability to bind actin filaments directly via its CHD (Bashour et al., 1997; Fukata et al., 1997; Mateer et al., 2004). This property of IQGAP1 may further stimulate actin filament nucleation by increasing the affinity for pre-existing filaments of the nucleation machinery that comprises activated forms of N-WASP and the Arp2/3 complex.

Further complicating actin assembly regulation by IQGAP1 is the fact that activated forms of Cdc42 or Rac1 can bind either IQGAP1 or N-WASP, and activate the latter independently of IQGAP1. In the absence of N-WASP, activated Cdc42 has been reported to enhance the ability of IQGAP1 to cross-link actin filaments, which implies that Cdc42 binding increases the affinity of IQGAP1 for F-actin (Fukata et al., 1997). In addition, we have reported that full length IQGAP1 and activated Cdc42 can co-stimulate actin filament nucleation *in vitro* through N-WASP and the Arp2/3 complex (Benseñor et al., 2007).

The current study was undertaken to gain further insight into how the combination of IQGAP1, N-WASP and activated Cdc42 influence actin assembly through the Arp2/3 complex, and to compare Cdc42 and Rac1 in this context. Using purified proteins for *in vitro* reconstitution experiments, we found that Cdc42 increases the affinity of IQGAP1 for N-WASP in a dose-dependent manner, while Rac1 had the converse effect. These opposing properties of Cdc42 and Rac1 on

IQGAP1 binding to N-WASP were reflected in Arp2/3 complex-dependent actin assembly assays. Whereas Cdc42 and IQGAP1 worked together to reduce the lag time before peak assembly rates were reached over a range of Cdc42 concentrations, lag times in the presence of Rac1 and IQGAP1 were reduced at low Rac1 concentration, but not at high Rac1. Reinforcing these *in vitro* findings are results of FRET microscopy in living cells, which indicated a closer association of IQGAP1 with Cdc42 than with Rac1. We therefore conclude that Cdc42 and Rac1 act by distinct mechanisms to regulate IQGAP1-stimulated actin assembly.

Results

To characterize interactions among IQGAP1, N-WASP, Cdc42 and Rac1, a series of *in vitro* binding experiments was performed using purified recombinant versions of these proteins. The same proteins, along with purified preparations of native actin and Arp2/3 complex, were used for actin polymerization assays. Note that although the Cdc42 and Rac1 used throughout this study were often in the form of dimeric GST fusion proteins (Guthenberg and Mannervik, 1981), and full length IQGAP1 is a natural homodimer (Bashour et al., 1997), all protein concentrations specified in this report refer to monomeric Cdc42, Rac1 or IQGAP1. Moreover, GST-tagged and untagged small G proteins yielded indistinguishable results in actin assembly assays at comparable concentrations of monomeric Cdc42 or Rac1.

Bimolecular interactions and effects on actin assembly

Full length his-tagged IQGAP1 bound to the GTP γ S activated forms of both GST-tagged Cdc42 and Rac1 in solution (Supplementary Figure 1), consistent with reports from other groups (Hart et al., 1996; Kuroda et al., 1996; McCallum et al., 1996). Prior studies of N-WASP (Miki et al., 1998) and the closely related protein, WASP (Symons et al., 1996), had indicated that both proteins can bind activated Cdc42, but not activated Rac1. Although we did not investigate WASP in the present study, we did find that N-WASP bound with apparently similar affinities to both Cdc42 and Rac1 when these small G proteins were pre-loaded with GTP γ S, but not with GDP (Figure 1A).

To study effects on actin assembly of N-WASP binding to GTP γ S-Rac1, we used a spectrofluorometric assay to monitor the rise in pyrene-actin fluorescence that accompanies its polymerization (Benseñor et al., 2007; Bryan and Coluccio, 1985). As shown in Figure 1B, GTP γ S-loaded versions of either Rac1 or Cdc42 exhibited dose-dependent stimulation of pyrene-actin assembly in the presence of N-WASP and the Arp2/3 complex, primarily by reducing the lag time before peak

rates of polymerization were achieved. In light of the original claim that N-WASP does not bind Rac1 (Miki et al., 1998), the binding and actin assembly results presented here respectively explain and confirm a surprising recent report that activated Rac1, like activated Cdc42, can stimulate actin filament nucleation through N-WASP and the Arp2/3 complex (Tomasevic et al., 2007).

Trimolecular interaction and effects on actin assembly

To determine how Cdc42 and Rac1 influence binding of IQGAP1 to N-WASP, GTP γ S-loaded versions of each small G protein were mixed at various concentrations between 5 nM and 1.28 μ M with fixed concentrations of IQGAP1 (100 nM) and N-WASP (150 nM), and the multi-protein complexes that formed were immunoprecipitated (IP'd) with anti-IQGAP1. Finally, western blotting was used to reveal the content of IQGAP1, N-WASP, and Cdc42 or Rac1 in each IP.

As shown in Figure 2A, Cdc42 increased the amount of N-WASP in anti-IQGAP1 immunoprecipitations (IPs). Between 0 and 40 nM Cdc42, approximately 1/3 of the available N-WASP co-IP'd with IQGAP1, but nearly all of the N-WASP was present in the IPs at Cdc42 concentrations of 80 nM and higher. Peak levels of Cdc42 in the IPs were reached at a total Cdc42 concentration approaching 320 nM, when $\sim$ 2/3 of the Cdc42 was complexed with IQGAP1 and N-WASP. Taken together, these data indicate that complexes of N-WASP and IQGAP1 are able to accommodate more N-WASP when Cdc42 is also incorporated into the complexes.

Corresponding pyrene-actin assembly assays were performed using fixed concentrations of actin (2 μ M), N-WASP (50 nM), Arp2/3 complex (50 nM) and IQGAP1 (90 nM), along with 100-200 nM Cdc42 that had been activated with GTP γ S (Figure 2B). When Cdc42 or IQGAP1 were used individually as the sole activators of N-WASP, the $V_{\max}$ of actin assembly was much faster for Cdc42 at all concentrations tested than for IQGAP1, although only minimal differences were observed for the lag times before $V_{\max}$ was reached. When used in combination, however, IQGAP1 plus 100 nM Cdc42 supported much more robust actin

assembly, as indicated by a dramatic reduction in the lag time before assembly $V_{\max}$ was achieved and a small, but significant increase in $V_{\max}$. Co-stimulation of actin assembly by IQGAP1 and Cdc42 was also observed at 150 nM and 200 nM Cdc42, but less dramatically. In both cases assembly $V_{\max}$ was unaffected by the presence of IQGAP1, but the inclusion of IQGAP1 reduced the lag time before the peak assembly rate was reached at 150 nM Cdc42, and to a lesser extent at 200 nM Cdc42. Cdc42 and IQGAP1 can thus act synergistically to promote actin filament nucleation through N-WASP and the Arp2/3 complex, but the extent to which they synergize is sensitive to their concentrations.

The binding and actin assembly experiments that were performed using the combination of Rac1, IQGAP1 and N-WASP yielded a strikingly different set of results. In contrast to Cdc42 and as shown in Figure 3A, Rac1 decreased the amount of N-WASP in anti-IQGAP1 IPs. Nearly all of the available N-WASP co-IP'd with IQGAP1 in the absence of Rac1, but Rac1 caused a dose-dependent loss of N-WASP from the IPs. At the upper range of total Rac1, nearly half of the available N-WASP was excluded from the IPs. Conversely, the amount of Rac1 in the IPs increased in a dose-dependent manner until saturation binding was achieved at a total Rac1 concentration of 40-80 nM. Rac1 and Cdc42 thus have opposite effects of the association of IQGAP1 with N-WASP, with Rac1 inhibiting and Cdc42 promoting association.

The actin assembly assays using Rac1 and IQGAP1 (Figure 3B) were performed identically to those using Cdc42 and IQGAP1, except for the change in small G protein. The $V_{\max}$ of actin assembly was much faster for Rac1 at all concentrations tested than for IQGAP1, and Rac1 both increased $V_{\max}$ and decreased the lag time before $V_{\max}$ was reached in a dose-dependent manner. The results for 100 nM Rac1 in presence of IQGAP1 were similar to the corresponding Cdc42 experiments. The two proteins acted synergistically and potentially to decrease the lag time to peak assembly rates, but the assembly $V_{\max}$ for 100 nM Rac1 was unaffected by the presence of IQGAP1. This similarity between Rac1 and Cdc42 broke down at higher Rac1 concentrations. The assembly $V_{\max}$ at both 150 nM and 200 nM Rac1 was slightly faster for Rac1 alone than for the combination of Rac1 and IQGAP1. Furthermore, although the delay

before peak assembly kinetics achieved was shorter for the combination than for Rac1 alone at 150 nM, this difference was abolished at 200 nM Rac1. This suggests that IQGAP1 and Rac1 act synergistically to stimulate actin filament nucleation at low Rac1 concentrations, but has the opposite effect at higher Rac1 levels.

References

- Bashour, A.-M., Fullerton, A. T., Hart, M. J. and Bloom, G. S. (1997).** IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *J. Cell Biol.* **137**, 1555-1566.
- Benseñor, L. B., Kan, H. M., Wang, N., Wallrabe, H., Davidson, L. A., Cai, Y., Schafer, D. A. and Bloom, G. S. (2007).** IQGAP1 regulates cell motility by linking growth factor signaling to actin assembly. *J Cell Sci* **120**, 658-69.
- Brandt, D. T., Marion, S., Griffiths, G., Watanabe, T., Kaibuchi, K. and Grosse, R. (2007).** Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *J Cell Biol* **178**, 193-200.
- Briggs, M. W. and Sacks, D. B. (2003).** IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* **4**, 571-574.
- Brill, S., Li, S., Lyman, C. W., Church, D. M., Wasmuth, J. J., Weissbach, L., Bernards, A. and Snijders, A. (1996).** The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4869-4878.
- Bryan, J. and Coluccio, L. M. (1985).** Kinetic analysis of F-actin depolymerization in the presence of platelet gelsolin and gelsolin-actin complexes. *J Cell Biol* **101**, 1236-44.
- Fukata, M., Kuroda, S., Fujii, K., Nakamura, T., Shoji, I., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kikuchi, A. and Kaibuchi, K. (1997).** Regulation of cross-linking activity of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. *J. Biol. Chem.* **272**, 29579-29583.

Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F. and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 Capture Microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* **109**, 873-885.

Guthenberg, C. and Mannervik, B. (1981). Glutathione S-transferase (transferase pi) from human placenta is identical or closely related to glutathione S-transferase (transferase rho) from erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **661**, 255-260.

Hart, M. J., Callow, M. G., Souza, B. and Polakis, P. (1996). IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a RasGAP-related domain, is a potential effector for Cdc42Hs. *EMBO J.* **15**, 2997-3005.

Joyal, J. L., Annan, R. S., Ho, Y.-D., Huddleston, M. E., Carr, S. A., Hart, M. J. and Sacks, D. B. (1997). Calmodulin modulates the interaction between IQGAP1 and Cdc42. *J. Biol. Chem.* **272**, 15419-15425.

Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K. (1996). Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J. Biol. Chem.* **271**, 23363-23367.

Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H. et al. (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Science* **281**, 832-5.

Le Clainche, C., Schlaepfer, D., Ferrari, A., Klingauf, M., Grohmanova, K., Veligodskiy, A., Didry, D., Le, D., Egile, C., Carlier, M. F. et al. (2007). IQGAP1 stimulates actin assembly through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* **282**, 426-35.

Mateer, S. C. and Bloom, G. S. (2003). IQGAPs: integrators of the cytoskeleton, cell adhesion machinery and signaling networks. *Cell Motil. Cytoskel.* **55**, 147-155.

Mateer, S. C., McDaniel, A. E., Nicolas, V., Habermacher, G. M., Lin, M.-J. S., Cromer, D. A., King, M. E. and Bloom, G. S. (2002). The Mechanism for Regulation of the F-actin Binding Activity of IQGAP1 by Calcium/Calmodulin. *J. Biol. Chem.* **277**, 12324–12333.

Mateer, S. C., Morris, L. E., Cromer, D. A., Benseñor, L. B. and Bloom, G. S. (2004). Actin filament binding by a monomeric IQGAP1 fragment with a single calponin homology domain. *Cell Motil. Cytoskel.* **58**, 231-241.

McCallum, S. J., Wu, W. J. and Cerione, R. A. (1996). Identification of a putative effector of Cdc42Hs with high sequence similarity to the RasGAP-related protein IQGAP1 and a Cdc42Hs binding partner with similarity to IQGAP2. *J. Biol. Chem.* **271**, 21732-21737.

Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y. and Takenawa, T. (1998). Induction of filopodium formation by a WASP-related actin-depolymerizing protein N-WASP. *Nature* **391**, 93-96.

Rittmeyer, E. N., Daniel, S., Hsu, S.-C. and Osman, M. A. (2008). A dual role for IQGAP1 in regulating exocytosis. *J Cell Sci* **121**, 391-403.

Roy, M., Li, Z. and Sacks, D. B. (2004). IQGAP1 binds ERK2 and modulates its activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 17329-17337.

Roy, M., Li, Z. and Sacks, D. B. (2005). IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling. *Mol. Cell Biol.* **25**, 7940-7952.

Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J. B., Daviet, L., Camonis, J., D'Souza-Schorey, C. and Chavrier, P. (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J Cell Biol* **181**, 985-98.

Symons, M., Derry, J. M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U. and Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* **84**, 723-734.

Tomasevic, N., Jia, Z., Russell, A., Fujii, T., Hartman, J. J., Clancy, S., Wang, M., Beraud, C., Wood, K. W. and Sakowicz, R. (2007). Differential regulation of WASP and N-WASP by Cdc42, Rac1, Nck, and PI(4,5,)P2. *Biochemistry* **46**, 3494-502.

Wang, S., Watanabe, T., Noritake, J., Fukata, M., Yoshimura, T., Itoh, N., Harada, T., Nakagawa, M., Matsuura, Y., Arimura, N. et al. (2007). IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *J Cell Sci* **120**, 567-77.

Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T. and Kaibuchi, K. (2004). Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev. Cell* **7**, 871-883.

Weissbach, L., Bernards, A. and Herion, D. W. (1998). Binding of myosin essential light chain to the cytoskeleton-associated protein IQGAP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **251**, 269-276.

Weissbach, L., Settleman, J., Kalady, M. F., Snijders, A. J., Murthy, A. E., Yan, Y.-X. and Bernards, A. (1994). Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding domains. *J. Biol. Chem.* **269**, 20517-20521.

Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S. I., Chen, Y. E., Tojo, T., Fukai, T., Fujimoto, M., Patrushev, N. A., Wang, N. et al. (2004). IQGAP1, a Novel VEGF Receptor Binding Protein Involved in Reactive Oxygen Species-dependent Endothelial Migration and Proliferation. *Circ. Res.* **95**, 276-283.

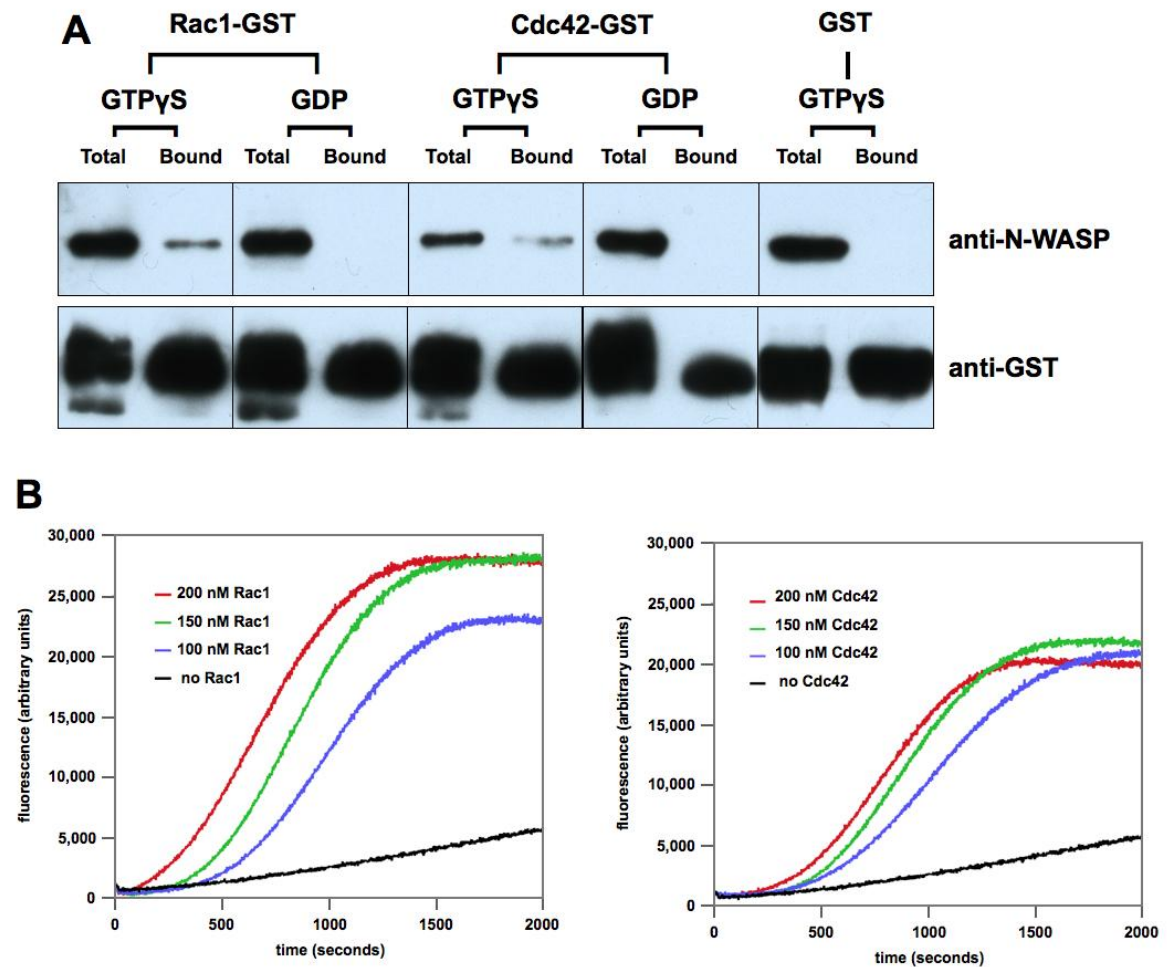


Figure 1. Rac1, like Cdc42, binds N-WASP and stimulates actin assembly through the Arp2/3 complex. A) 200 nM GST-Rac1 or GST-Cdc42 were loaded with GTPγS or GDP, and mixed with 200 nM N-WASP. Protein complexes were then adsorbed to glutathione-Sepharose beads, and western blotting was used to compare Total versus Bound protein. B) Effects of GTPγS-loaded Rac1 and Cdc42 on actin assembly were monitored by spectrofluorometry. Samples contained 2 μM G-actin (5% labeled with pyrene), 50 nM N-WASP, 50 nM Arp2/3 complex and the indicated concentrations of GST-Rac1 or GST-Cdc42. Note: small G protein concentrations refer to Rac1 and Cdc42 monomers in this and all subsequent figures.

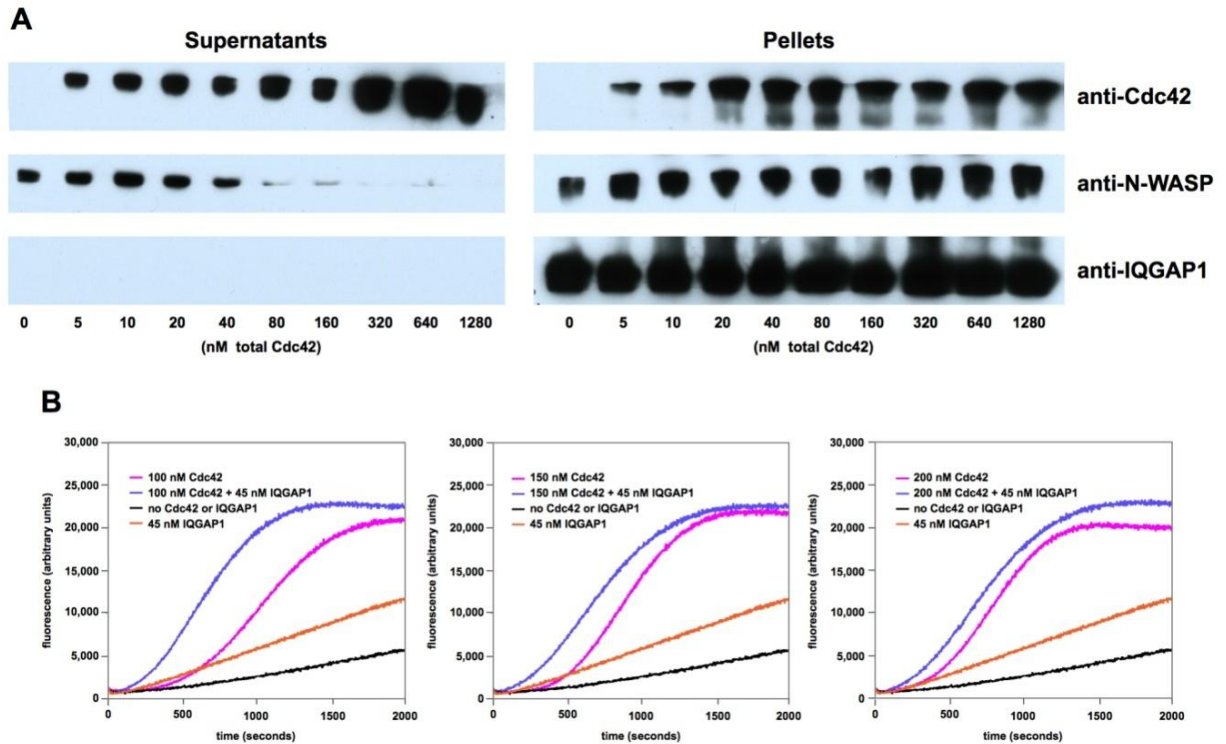


Figure 2. Cdc42 promotes association of N-WASP with IQGAP1, and acts additively with IQGAP1 to stimulate actin assembly. A) Solutions of 100 nM IQGAP1 plus 150 nM N-WASP were adsorbed to Protein G-Sepharose beads that were pre-saturated with anti-IQGAP1, and then were mixed with the indicated concentrations of GTP γ S-loaded GST-Cdc42. The beads were then collected by centrifugation, and the Pellets and Supernatants were analyzed by western blotting. B) Actin assembly was monitored by spectrofluorometry. Samples contained 2 μ M total G-actin (5% labeled with pyrene), 50 nM N-WASP, 50 nM Arp2/3 complex, 45 nM IQGAP1 (homodimers) and the indicated concentrations of GTP γ S-loaded GST-Cdc42.

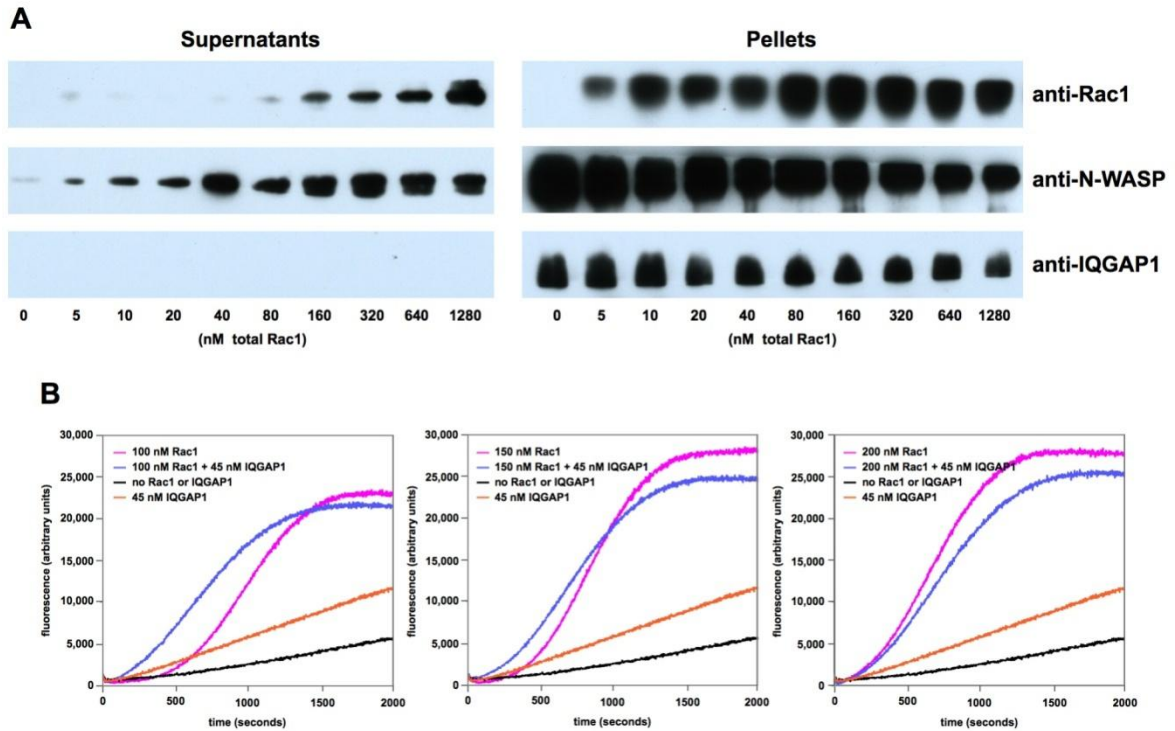


Figure 3. Rac1 inhibits association of N-WASP with IQGAP1, and acts bimodally with IQGAP1 to regulate actin assembly. A) Solutions of 100 nM IQGAP1 plus 150 nM N-WASP were adsorbed to Protein G-Sepharose beads that were pre-saturated with anti-IQGAP1, and then were mixed with the indicated concentrations of GTP γ S-loaded GST-Rac1. The beads were then collected by centrifugation, and the Pellets and Supernatants were analyzed by western blotting. B) Actin assembly monitored by spectrofluorometry. Samples contained 2 μ M G-actin (5% labeled with pyrene), 50 nM N-WASP, 50 nM Arp2/3 complex, 45 nM IQGAP1 (homodimers) and the indicated concentrations of GTP γ S-loaded GST-Rac1.

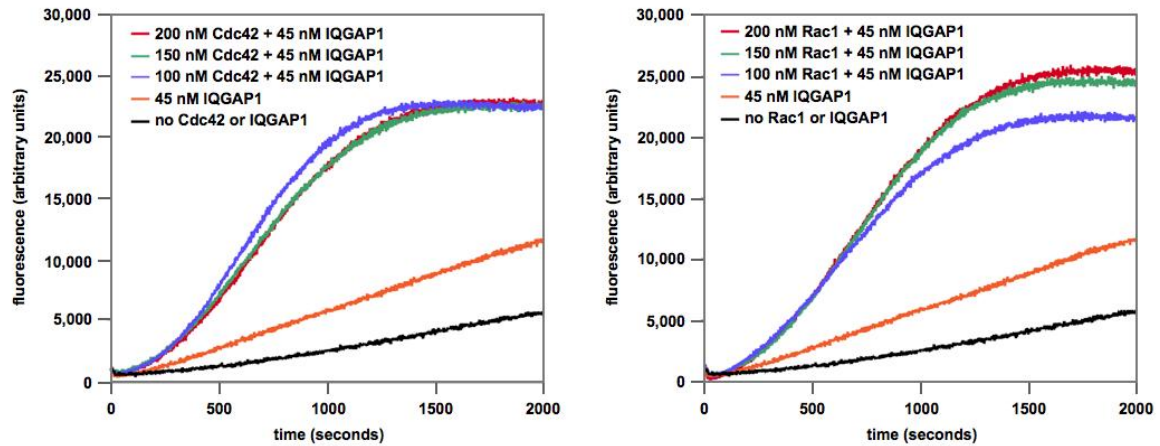


Figure 4. Actin assembly in the presence of constant IQGAP1 and variable Rac1 or Cdc42 is relatively sensible to the small G protein concentration below the 150nM. Samples contained 2 μ M total G-actin (5% labeled with pyrene), 50 nM N-WASP, 50 nM Arp2/3 complex, 45 nM IQGAP1 (homodimers) and the indicated concentrations of GTP γ S-loaded GST-Cdc42 or GST-Rac1.

CAPÍTULO III

**PURIFICAÇÃO DE IQGAP1 NATIVO E INTERAÇÃO DE N-WASP COM
PEQUENAS GTPases.**

RESUMO

Poucos artigos abordam a purificação de IQGAP1 nativos. Neste capítulo descrevemos um protocolo de purificação partindo de rins bovinos e usando técnicas de cromatografia para a separação de IQGAP1 das demais proteínas. O problema encontrado durante os experimentos foi a forte ligação estabelecida entre IQGAP1 e actina, dificultando a purificação. Verificou-se também que a ligação entre essas duas proteínas é influenciada pela concentração de NaCl presente no meio, desta maneira alterando as concentrações de sal, podemos separar essas proteínas.

Também foram abordadas as interações entre as pequenas GTPases (Rac1 e Cdc42) e N-WASP. Por meio de experimentos de *PullDown* foram mostrados que a interação entre essas proteínas não influencia diretamente na precipitação de N-Wasp.

INTRODUÇÃO

Este tópico apresenta resultados complementares do artigo apresentado no capítulo II, intitulado “Modulation of IQGAP1-Stimulated Actin Assembly by Cdc42 and Rac1”.

O processo de purificação de IQGAP1 nativo nunca foi mostrado anteriormente, sendo assim elaboramos um protocolo para purificação desta proteína. Os resultados descrevem o processo de purificação que desenvolvemos partindo de rins bovinos. Desta maneira todos os procedimentos e materiais utilizados estão descritos a seguir.

Também abordamos nesse capítulo as interações entre as pequenas GTPases (Cdc42 e Rac1) com N-WASP. As GTPases de baixo peso molecular, Rac1 e Cdc42, podem se apresentar de duas maneiras, uma inativa, baseada em GDP, e outra ativa, baseada em GTP, sendo a forma baseada em GTP a que interage com as demais proteínas, induzindo várias mudanças de organização dos filamentos do citoesqueleto. Rac1 estimula mudanças conformacionais na membrana plasmática e a formação de pseudópodos. Por outro lado, Cdc42 estimula a migração celular e a comunicação intercelular (Bashour et. Al, 1997). A ativação destas duas GTPases, como relatado em outros trabalhos, induz a reorganização de todo o citoesqueleto e influencia vários mecanismos celulares, como migração, comunicação intercelular, capacidade de formação de pseudópodos, entre outras. Como IQGAP1 tem interação direta com Rac1 e Cdc42, ele está envolvido em todos os processos de regulação da ação destas proteínas.

N-WASP é outra proteína relacionada a regulação da dinâmica de citoesqueleto. Entre os principais sítios ativos desta proteína, podemos citar uma região BR (basic region), seguido por um domínio CRIB (Cdc42-Rac interactive binding domain), que é onde acontece a ligação de Cdc42 e Rac, e um domínio VCA (C-terminal catalytic domain), no qual acontece a ligação do complexo Arp2/3 e do filamento de actina (Le Clainche et. al, 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

ATP, TRIS, KCl, BSA, $MgCl_2$, HEPES, $CaCl_2$, NaCl foram adquiridos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO). Tween, EDTA, EGTA e reagentes para eletroforese como acrilamida; Bis acrilamida 29:1, Temed, duodecil sulfato de sodio (SDS), persulfato de amônia e padrões de massa molecular foram adquiridos de Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA). Anticorpo anti-actina monoclonal de coelho foi adquirido da Abcam Inc. (Cambridge, MA). Anti-Cdc42 e Anti-Rac1 foram adquiridos da Millipore Corporation (Billerica, MA), anti-IQGAP1 monoclonal gerado em camundongo e actina foram gentilmente cedidos pelo Dr George Bloom. Anticorpos secundários Anti-mouse e Anti-rabbit conjugados com peroxidase foram adquiridos da PerkinElmer Inc. (Waltham, Massachusetts). Os outros reagentes foram de grau analítico de fornecedores brasileiros e americanos. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada com resistividade mínima de 18 M Ω (Milli Q).

Rac1 (~21 kDa), N-WASP (55 kDa), Cdc42 (~21kDa) e seus mutantes foram gentilmente cedidos pelo Dr. George Bloom.

Para a coloração com prata foi usado o kit de coloração com prata da Thermo Fisher Scientific Inc.

Para os experimentos de cromatografia de afinidade utilizamos CM Sepharose GL-6B e Affi-gel obtidas da GE Healthcare e Glutathione sepharose 4B obtida da Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).

Actina (~42 kDa) purificada de coelho foi gentilmente cedida pela Dr. Dorothy Schafer.

Purificação de proteínas

Enriquecimento de IQGAP1

Rins bovinos adultos foram retirados rapidamente, logo após o sacrifício do animal, transportados em tampão salino de fosfato (PBS) a 4 °C. O tecido foi homogeneizado imediatamente após o transporte.

Todos os passos posteriores foram realizados a 4°C, exceto quando descrito. Uma massa de ~150 g de rim, sem gordura e tecido conectivo foi homogeneizado em 250 mL de tampão contendo Tris 50 mM (pH 7,4), EGTA 1 mM, Sacarose 300 mM, DTT 1 mM, 2.5 mL coquetel de inibidores de protease (10 µg/mL de cada inibidor de protease, sendo eles: leupeptin, chymostatin e pepstatin A) em um homogenizador Ultra Turax IKA T18 Basic, probe S18N 19G, 3 min na velocidade 4. O homogeneizado foi centrifugado a 16.500 x g por 30 min e o sobrenadante (S1) foi coletado. O S1 foi centrifugado a 186.000 x g por 90 min o precipitado (P2) foi descartado e ao sobrenadante (S2) foi adicionado NaCl e Triton X-100 para concentração final de 150 mM e 1%, respectivamente. Sendo então filtrado em filtro de 0.45 µm de diâmetro. O filtrado foi aplicado em uma coluna (0.8 x 4 cm) mista de CM Sepharose CL-6B e Affigel com volume total de 2 mL (1:1 (v:v)) equilibrada previamente com Tris 50 mM, pH 7, EGTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM, coquetel de inibidor de protease (10 µg/mL de leupeptin, chymostatin, e pepstatin A). Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 50 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EGTA, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, coquetel de inibidor de protease (10 µg/ml de leupeptin, chymostatin e pepstatin A). A amostra foi eluída com 6 mL de tampão contendo Tris 50 mM, pH 7.4, EGTA 1 mM, NaCl 150 mM, NaSCN 1 M, DTT 1 mM, coquetel de inibidor de protease (10 µg/ml de leupeptin, chymostatin e pepstatin A), sendo coletadas em frações de 1 mL.

As frações coletadas foram reunidas e 200 µL foram aplicados em um gradiente não linear de sacarose a 5%, 10%, 15%, 20%, em Tris 50 mM (pH 7,4), EGTA 1 mM, NaCl 150 mM, NaSCN 1 M, DTT 1 mM, coquetel de inibidores de protease (10 µg/ml de leupeptin, chymostatin, e pepstatin A). O gradiente foi montado de forma crescente em um total de 2 mL e armazenado em temperatura ambiente por 1 h, até os anéis que delimitam os gradientes ficarem visíveis. O

concentrado de proteínas foi aplicado gentilmente, logo acima da camada de sacarose. Após centrifugar a 258.000 x g por 4 h a 4⁰C (rotor TLS-55, Beckman), calmamente foram coletados, sucessivamente, várias amostras de 175µL partindo do topo do tubo em direção ao fundo. As amostras foram armazenadas em tampão de amostra para futura análise por SDS-PAGE, Western blot ou espectrometria de massa.

Após a eluição da coluna, outra estratégia para separar IQGAP1 e actina, foi dialisar a amostra coletada após a cromatografia de afinidade em Tris 50 mM pH 7.4, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, DTT 1 mM e 1 mL de coquetel inibidor de protease durante 10 horas, após este procedimento, centrifugar as amostras a 120.000 x g (rotor TLA 120.1, Beckman) por 90 minutos, adicionando altas concentrações de sal (NaCl 0.5 M, NaCl 1 M e ureia 1 M). Foi coletada uma amostra pre-centrifugação(Total), sobrenadante(S) e precipitado(P). Todas as amostras foram armazenadas em tampão de amostra (Tris 50mM pH 6.8, 2% SDS (v:v), Glicerol 10% (v:v), 1% β-mercaptoethanol (v:v) e de Azul de Bromofenol 0.02% (m:v)).

Polimerização da actina

Para a polimerização, a actina foi incubada a 27 °C por uma h em Tampão de polimerização de actina (Tris 2mM pH 8.0, CaCl₂ 0.2mM, NaN₃ 0.2 mM) e feita a suplementação com KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, ATP 1 mM e NaN₃ 1mM.

A polimerização foi testada em experimentos de precipitação e observação em SDS-PAGE (dados não mostrados).

PullDown

Glutathione-Sepharose 4B beads (Pharmacia) foram equilibrados em *binding/washing buffer* contendo HEPES 20 mM pH 7.6, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM. Este procedimento foi repetido três vezes. GTPase foi ativada adicionando 0,2238 mmol/L de Rac1 em Tris 50 mM pH 7.5, DTT 1 mM, KCl 20

mM, EDTA 5 mM, GTP/GDP 1 mM, BSA 1mg/mL e incubado por 10 min a 30°C, após este procedimento, foi adicionado MgCl₂ ate atingir a concentração final de 20 mM e incubado por dois min em gelo. Após a ativação de Rac1, foi adicionado 50 nmoles de N-WASP (500 nmol/L) incubado, juntamente com os *beads* previamente preparados, em rotação orbital por uma h em temperatura ambiente (volume final: 600 µL). Logo depois, uma amostra foi retirada (total) para futura análise por western blot ou SDS-PAGE. Os *beads* foram centrifugados à 2000 x g por três min. Todo o sobrenadante foi coletado (Sup) e o precipitado foi centrifugado novamente à 2000 x g por três min, ressuspendido em 600 µL de *Binding Buffer* (HEPES 20mM pH 7.6, KCl 100mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, 0.1% Tween-20 (v:v)), e armazenado para análise em SDS-PAGE ou Western Blot. Todas as amostras para análise foram colocadas em tampão de amostra 5 vezes concentrado (como descrito anteriormente), aquecidas a 90°C por três min e mantidas a -20°C.

Para os experimentos com Cdc42, foram utilizadas o mesmo procedimento, preparando os *Beads* com *Binding Buffer* nas mesmas proporções descritas anteriormente. O processo de ativação também foi feito da mesma maneira.

Para esse experimento, utilizamos três tipos de Cdc42, sendo estes Cdc42 WT (*cdc42wt*) como proteína conservada, Cdc42ΔIQ (não possui o domínio ligante de IQGAP1) e Cdc42ΔNW (não possui o domínio ligante de N-WASP). Todos estes mutantes foram fornecidos, gentilmente, pelo professor Dr. George Bloom. As amostras foram incubadas com N-WASP, na presença de GTP ou GDP, coletando uma amostra antes da centrifugação, sendo esta a amostra Total (T). Os *beads* foram centrifugados a 2000 x g por três min e o sobrenadante totalmente coletado (S). O precipitado foi ressuspendido com os mesmos volumes da pre-centrifugação (P). Todas as amostras foram estocadas como o experimento descrito anteriormente e analisadas por SDS-PAGE.

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.

Os resultados foram monitorados por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) em diferentes mini-géis (10 x 8 x 0,75 mm), com gel de empilhamento de 4% e gel de separação com concentrações que variaram entre 8-15%.

As amostras para eletroforese foram preparadas em tampão de amostra 5 vezes concentrado (Tris-HCl 625 mM pH 6.8, Glicerol 10% (v:v), SDS 4% (v:v), 5% (v:v) β -mercaptoetanol e 0.25% (v:v) azul de bromofenol), aquecendo-as por três minutos a 90°C.

A corrida eletroforética foi realizada com voltagem constante de 100V por, aproximadamente, uma hora a 4 °C em tampão de Tris-Glicina pH 8,8, com 0,1% de SDS. Após a corrida, os géis foram corados e descorados pelo método descrito por Weber & Osbourne (1969), corando com uma solução contendo Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v:v) metanol e 10% (v:v) ácido acético por cerca de 12 horas e foram descorados com uma solução contendo 30% (v:v) etanol e 10% (v:v) ácido acético ou transferidos para membrana de nitrocelulose (de 0.45 μ m, comprado da Bio-Rad Laboratories Inc.) para posterior detecção imunológica de proteínas diversas.

Padrões de massa molecular, pre-corados (*precision plus proteintm dual color standards*, adquiridos da Bio-Rad Laboratories Inc.) e não corados (*precision plus proteintm unstained standards*) foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories Inc. e foram utilizados como referência de massa molecular.

Western Blot

As proteínas foram transferidas eletroforéticamente para membranas de nitrocelulose (Towbin e col., 1979). O gel foi embebido em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20% (v:v) etanol) juntamente com a membrana de nitrocelulose e logo depois foi posto em contato com a membrana e a transferência foi efetuada a 200 mA, durante duas horas a 4°C.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi incubada por uma hora em TBST (20 mM de Tris pH 7.6, 137 mM de NaCl e 0.1% (v:v) Tween 20), contendo 10% (m:v) de leite em pó desnatado por uma hora para bloquear os sítios livres na membrana de nitrocelulose.

Posteriormente, a membrana de nitrocelulose foi incubada por uma h com anticorpo primário, diluído em TBS (20 mM de Tris pH 7.6, 137 mM de NaCl), contendo leite em pó desnatado 5% (m:v) na proporção de 1:1000, durante uma h. Posteriormente, a membrana foi incubada em anticorpo secundário, conjugado com peroxidase, diluídos na proporção de 1:500 na mesma solução do anticorpo primário, por 30-40 min. Entre uma incubação e outra, a membrana foi lavada com TBST. A revelação foi feita por quimioluminescência, utilizando kit apropriado (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate – Thermo Scientific).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Enriquecimento de IQGAP1

Ao contrário da maioria dos estudos relacionados a famílias das proteínas IQGAPs, cuja purificação é feita por meio do enriquecimento ou de proteínas recombinantes, o objetivo central deste trabalho foi tentar estabelecer um protocolo para purificação de IQGAP1 nativo, partindo de rins bovinos e verificando a influência de NaCl em sua ligação com actina juntamente com a caracterização de sua ligação com outras proteínas. Esses trabalhos têm no resultado final algum tipo de contaminação, não apresentando a amostra totalmente pura. Desta forma, para iniciar a caracterização de IQGAP1, procuramos estabelecer um método de purificação satisfatório para IQGAP1.

Todas as etapas deste protocolo foram analisadas por SDS-PAGE e/ou *Western Blot* para tentar diminuir ao máximo a perda de rendimento durante os procedimentos aplicados. Para estabelecer este método de purificação, foi usado como base a massa molecular aparente do IQGAP1 para definir a velocidade de centrifugação usada durante os primeiros passos da preparação. A figura 1 mostra o perfil eletroforética das amostras obtidas durante o processo de enriquecimento de IQGAP1. Após as eluições da cromatografia de afinidade, observa-se no painel A o grau de enriquecimento obtido ao final deste processo, sendo analisado por SDS-PAGE (figura 1A).

Em todas as preparações, as amostras obtidas após a cromatografia de afinidade, usando CaM Sepharose, apresentaram uma forte banda contaminante presente entre 37 e 50 kDa. Estas amostras foram analisadas, posteriormente, por Western Blot, utilizando anti-corpos específicos para IQGAP1, mostrando resultados positivos, como vemos na figura 1B. Nesta mesma figura podemos observar muitas marcações distantes, isto se deve a degradação de IQGAP1 durante o processo de purificação.

Na tentativa de dissociar IQGAP1 e actina foi centrifugado o *pool* das amostras coletadas após a cromatografia de afinidade a 120.000 xg durante 90 min. Como mostrado na figura 2, com este procedimento ambas as proteínas precipitam, indicando que o processo de separação foi totalmente ineficiente. Por outro lado, estes resultados mostram as fortes ligações estabelecidas entre IQGAP1 e actina. Mesmo após forte centrifugação, a ligação entre essas duas proteínas não é desfeita, isto é mostrada por SDS-PAGE e por Western Blot. As amostras foram mostradas antes da centrifugação (T), com sinal referente a IQGAP1 e actina juntos, e as amostras após a centrifugação separadas em sobrenadante (S) e o precipitado (P). Não é detectado qualquer sinal no sobrenadante. Já no precipitado, é possível observar sinais semelhantes aos da amostra T, tanto para actina quanto para IQGAP1.

Uma alternativa para tentar separar IQGAP1 e actina foi usar um gradiente não linear de sacarose crescente de 5%, 10%, 15% e 20% (m:v), como descrito em material e métodos. Na figura 3, as amostras coletadas do gradiente de sacarose e analisadas por SDS-PAGE, coradas com nitrato de prata, a dissociação das proteínas não foi satisfatória. A amostra antes de ser colocada na cromatografia de afinidade (T) e após a cromatografia aplicada no gradiente de sacarose (1...13). Da amostra número 1 à amostra número 13 existe uma banda presente próxima a 250 kDa, referente a IQGAP1 e uma outra banda contaminante entre 37 e 50 kDa referente a actina.

Todos os procedimentos descritos com o objetivo de dissociar IQGAP1 e actina mostraram-se ineficazes até este momento.

Na tentativa de conseguir a possível dissociação de IQGAP1 e actina, a concentração de NaCl do material proveniente da cromatografia de afinidade foi elevada a 0.5M e centrifugado a 130.000 xg por 90 min. As amostras foram analisados por Western Blot, utilizando anti-corpos específicos para as duas proteínas, observado na figura 4.

Na amostra Total (T), pré-centrifugação, existe uma banda entre 150 e 250 kDa identificada pelo anticorpo sensível a IQGAP1 e, na mesma amostra, uma banda presente entre 37 e 50 kDa identificada pelo anticorpo sensível à actina. Após a centrifugação a amostra referente ao sobrenadante (S) e ao precipitado (P)(figura 4), no qual é possível observar que na amostra S existe uma forte banda referente a IQGAP1 e a banda referente a actina está muito mais fraca, em comparação com a T, já no P é possível observar um sinal mais intenso referente a IQGAP1 e um outro sinal intenso referente a actina.

Para reforçar os resultados obtidos no experimento anterior, foi elaborado outro experimento, similar ao anterior, onde a amostra proveniente da cromatografia de afinidade foi incubada na presença de 0.5M, 1M de NaCl ou 1M de ureia e centrifugadas a 130.000 xg, como descrito em material e métodos. A eletroforese seguida de *Western Blot* revelado por imunofluorescência (figura 5) indicou que o sinal referente a IQGAP1, em sua maior parte esta presente no sobrenadante juntamente com um fraco sinal referente a actina. As proteínas incubadas na presença de 1M de NaCl mostraram perfis de marcação semelhante às tratadas com 0.5M de NaCl, apresentando um sinal forte referente a IQGAP1 e, praticamente, nenhum sinal referente a actina no sobrenadante. Já na amostra P, um forte sinal referente a actina e um leve sinal referente a IQGAP1. As amostras tratadas com 1M de ureia não foram influenciadas, mostrando sinais de IQGAP1 e actina, simultaneamente no sobrenadante e no precipitado.

Em análises posteriores das amostras centrifugadas na presença de 0.5M de NaCl e 1M de NaCl, feitas por espectrometria de massa (dados não apresentados), os resultados indicaram contaminação por actina e miosina II.

Os dados apresentados mostram que, ao final de nosso protocolo de purificação, obtivemos uma fração com pouca contaminação. A principal proteína

contaminante foi identificada por western blot com anticorpo específico para actina e, posteriormente, também foi identificada contaminação por misina II. Durante o processo de enriquecimento, verificamos a forte ligação que é estabelecida entre IQGAP1 e Actina. Técnicas de sedimentação e cromatografia de afinidade (figura 2 e 3) foram aplicadas durante o processo, sem ter resultados positivos na separação destas proteínas. Entretanto, com base em alguns trabalhos anteriores (Fukata et al., 1997), foi visto que essa relação é sensível a concentração de NaCl presente no meio, mesmo que a ligação tenha se mostrado extremamente forte. Mostramos nas figuras 4 e 5 que aumentando a concentração de NaCl no meio, podemos quebrar esta forte ligação, desta maneira podemos precipitar as proteínas. Este procedimento pode acarretar a precipitação de parte da amostra de IQGAP1 em conjunto com actina, embora ainda possamos observar um sinal significativo, de actina no sobrenadante. Isto, certamente, deve-se ao fato de apenas parte do IQGAP1 ter se desligado da actina. Este sinal indica que a maior parte da proteína permanece no sobrenadante após a centrifugação e a parte que ainda está ligada precipita juntamente com a actina. Este processo pode ser aperfeiçoado, aplicando novas técnicas de separação de proteínas ou adequando melhor o tempo de centrifugação nos protocolos descritos, de forma a minimizar a perda de IQGAP1 durante o processo.

Existe uma grande variedade de proteínas que interagem com IQGAP1, incluindo Rac1 e Cdc42, actina, calmodulina, β -catenin, CLIP170, N-WASP, entre outras. Muitos dos mecanismos relacionados a regulação da ligação entre IQGAP1 e actina, ainda não foram demonstrados.

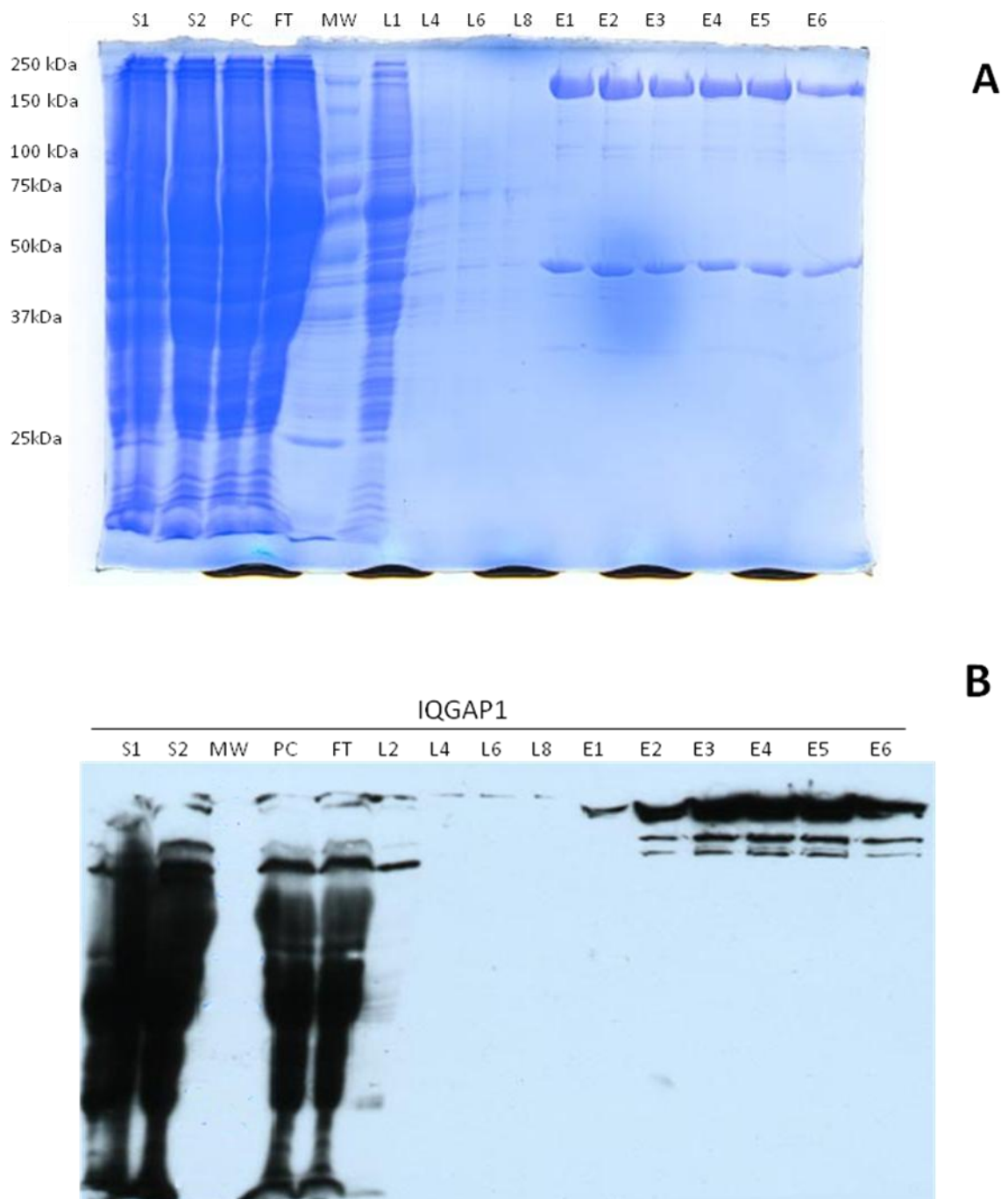


Figura 1. Etapas do enriquecimento de IQGAP 1. O Homogenato foi centrifugado uma vez a 16.500 xg e coletando o sobrenadante (S1). Sendo centrifugado novamente a 186.000 xg (S2), o sobrenadante é novamente coletado para aplicação em coluna de cromatografia de afinidade, coletando uma amostra antes de aplicar a amostra (PC). A coluna foi equilibrada e lavada com o mesmo bufferem que as proteínas se encontram, ao aplicarmos a primeira amostra na coluna, a amostra que passou pela resina foi coletada (FT) e reaplicada (L1 – L8), como descrito em material e métodos, e as proteínas foram eluídas na presença de 1M de NaSCN (E1 – E6) e monitoradas por SDS-PAGE 12%(A) e Western Blot, usando Anti IQGAP1 monoclonal(B). MW Marcador de peso molecular. Foi aplicado 10µl de amostra em cada poço.

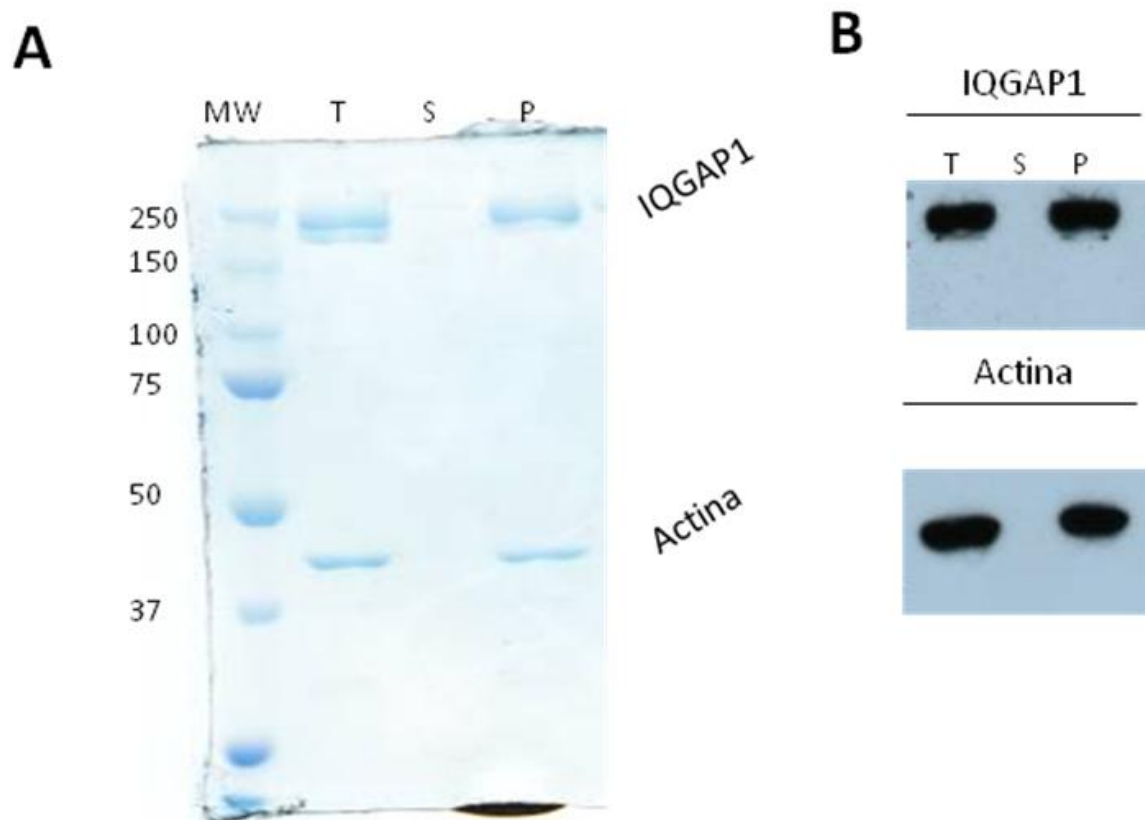


Figura 2. A co-sedimentação de IQGAP1 e actina. O pool de frações eluídas da cromatografia de afinidade foi centrifugada a 120.000 xg por 90 min. Uma amostra antes da centrifugação foi coletada (T). Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado(S) , o precipitado foi ressuspensionado em tampão de solubilização, mantendo a proporção pré-centrifugação(P). As amostras foram aplicadas em um SDS-PAGE 10%, corado com Coomassie blue (A) e o Western blot para identificação de actina e IQGAP1(B) Foi aplicado 10µl de amostra em cada poço.

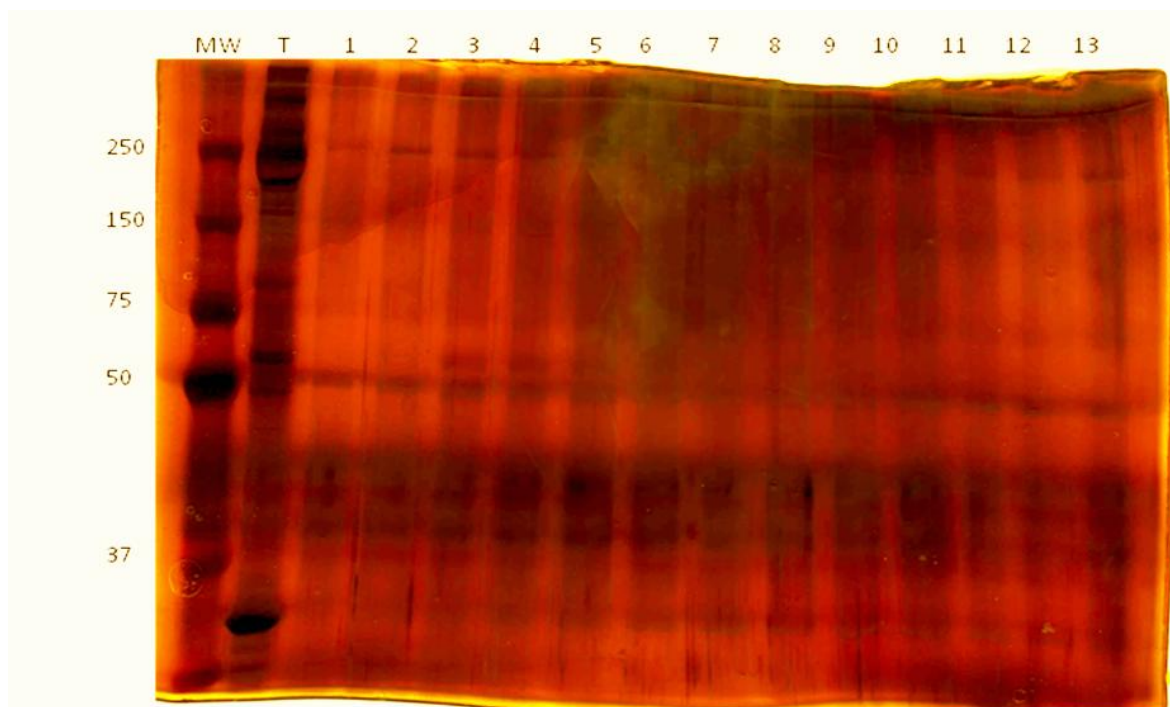


Figura 3. SDS-PAGE das amostras coletadas do gradiente não linear de sacarose das amostras eluídas da cromatografia de afinidade. O pool de proteínas coletado após a cromatografia de afinidade foi aplicado em um gradiente crescente não linear de sacarose de 5% 10% 15% 20% e centrifugado a 258.000 x g durante 4 h. As amostras foram coletadas em frações de 175 μ L e aplicadas em um SDS-PAGE de 10% corado com prata. Foi aplicado 10 μ L de amostra em cada poço.

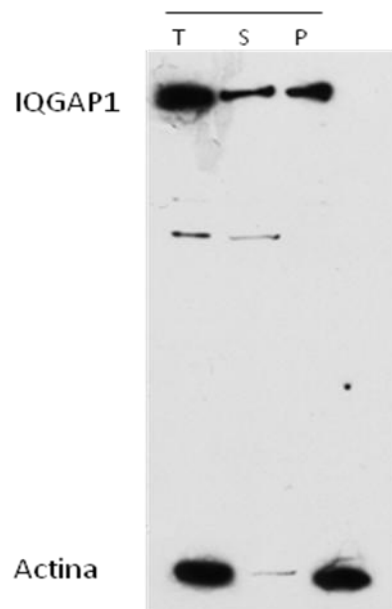


Figura 4. Western Blot referente as amostras obtidas da co-sedimentação de IQGAP1 e a actina na presença de alta concentração de sal. Ao pool de proteínas eluído da cromatografia de afinidade foi adicionado 0.6 M de NaCl e foi centrifugado a 130.000 x g por 90 min. Foi coletada uma amostra pré-centrifugação(T), o sobrenadante também foi coletado (S) e ao precipitado foi adicionado tampão de solubilização de maneira a manter a proporção pré-centrifugação. Western Blot foi feito com Anti-IQGAP1 monoclonal anti-actina monoclonal. Foram aplicado 10 μ L de amostra em cada poço.

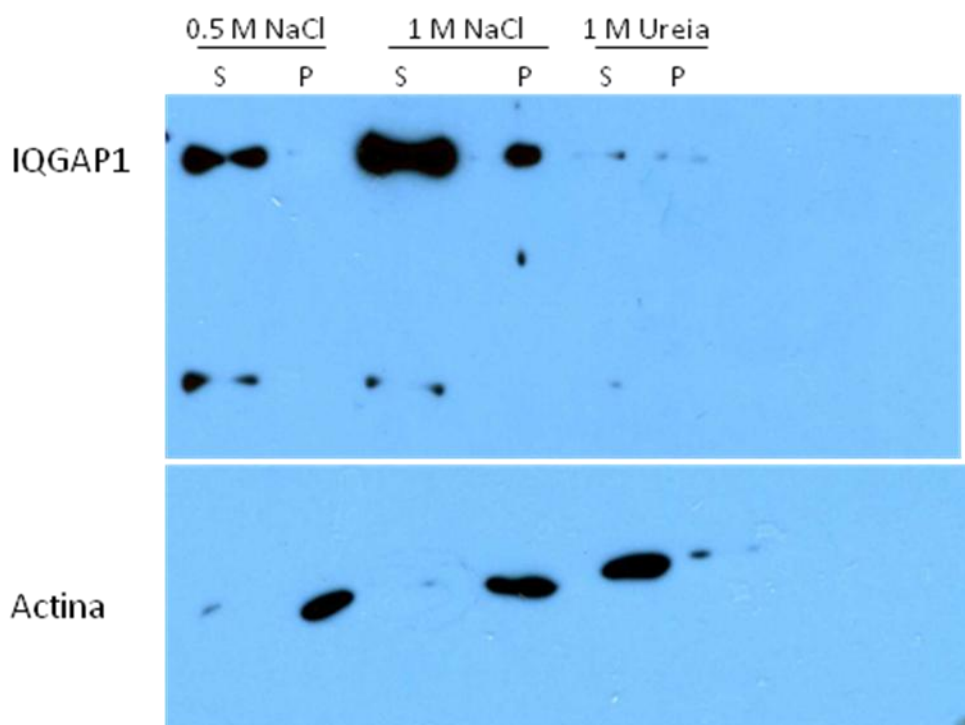


Figura 5. A co-sedimentação de IQGAP1 é dependente da concentração de sal. O pool de frações eluídas da cromatografia de afinidade teve a concentração de NaCl elevada a 0.5 M ou 1M. Alternativamente foi utilizado 1 M de ureia. As amostras foram centrifugadas a 130.000 x g por 90 min. O sobrenadante (S) foi coletado e foi adicionado ao precipitado (P). As proteínas foram, então, separadas por SDS-PAGE, transferidas e reveladas com anticorpos anti-IQGAP1 e anti-actina, como descrito em materiais e métodos.

Já é conhecido que uma das funções principais da proteína N-WASP é ativar o complexo Arp2/3, aumentando a velocidade da polimerização do filamento de actina. Outra função importante de N-WASP é sua interação com IQGAP1, mediando a sua atividade e regulando indiretamente a polimerização do citoesqueleto de actina.

Alguns autores sugerem que a atividade de N-WASP é modulada por Rac1. Com base nessa informação foi investigado a interação entre estas duas proteínas por meio de alguns experimentos de *pull-down*, como descrito em material e métodos. Na figura 6, a interação entre Rac1 e N-WASP na presença de GDP ou GTP. Essas proteínas foram incubadas juntamente com Glutathione-Sepharose 4B *beads*, uma amostra foi coletada antes da centrifugação, sendo esta a Total (T). Após a precipitação dos *beads*, coletamos o sobrenadante (S), com o mesmo tampão usado para equilibrá-los. Logo depois, foi adicionado ao precipitado a mesma quantidade de tampão retirada na amostra S e a amostra foi

centrifugada novamente, coletando todo o sobrenadantes (L). Ao precipitado foi adicionado tampão de amostra (P).

Todas as amostras foram analisadas por SDS-PAGE e em todas (T, S, L e P) é observado que não há diferença entre GTP e GDP. Na amostra S, grande parte das proteínas presentes da amostra não se ligou na resina. Tanto nas amostras tratadas com GTP quanto nas com GDP, as bandas são similares às referentes a amostra T. Na amostra L, é observado uma banda presente entre 50 e 75 kDa presente na amostra com GTP e uma similar na amostra com GDP. Na amostra referente ao precipitado (P), podemos observar duas fracas bandas, uma entre 50 e 75 kDa e outra entre 37 e 50 kDa. Nas amostras tratadas com GTP, aparentemente, as bandas presentes no precipitado são levemente mais fortes que as tratadas com GDP.

A influência da proteína Cdc42 na ligação presente entre IQGAP1 e N-WASP, e sua consequente interferência na polimerização do filamento de actina, foram elaboradas algumas proteínas recombinantes para experimentos de *pulldown*, como descrito em material e métodos. Entre as proteínas recombinantes estão Cdc42 Δ IQ, sendo esta proteína sem o domínio que liga IQGAP1 e o mutante Cdc42 Δ NW, sem o domínio ligante de N-WASP. Todas as amostras deste experimento foram analisadas por SDS-PAGE.

Na figura 7A, os resultados referentes a amostra total (T) antes da centrifugação e também as amostras referentes ao sobrenadante(S), após a centrifugação. Todas as amostras referentes a T não apresentam qualquer diferença significativa, mostrando fortes bandas que correspondem a todas as proteínas usadas neste experimento. Nas amostras referentes ao S, podemos perceber que o sinal da proteína WT, presente ente 37 e 50 kDa, está levemente diminuído, em relação ao sinal mostrado em T e em relação a proteína Δ IQ e Δ NW, sugerindo uma maior ligação à resina da proteína íntegra. Tanto o sinal referente a Δ IQ quanto Δ NW não apresentam qualquer diferença entre eles e nem em comparação com a amostra T(figura 7).

Na figura 7B, os resultados das amostras L da interação entre a proteína conservada e os dois mutantes de Cdc42, citado anteriormente. As amostras da

proteína WT e Δ NW não apresentaram qualquer diferença entre as tratadas com GTP ou GDP e nem comparando uma com a outra. Já as amostras referente a Δ IQ apresentam uma banda levemente mais fraca que as demais, tanto naquelas tratadas com GTP quanto nas tratadas com GDP.

Na figura 7C as amostras do precipitado dos mutantes e de Cdc42 conservadas, tanto na presença de GTP quanto GDP. Nessas, as bandas referentes a WT são levemente mais fracas que as proteínas mutantes, já essas proteínas não apresentam diferença entre as tratadas com GTP ou GDP.

A interação entre Rac1 e Cdc42 com N-WASP nos experimentos de *pull-down*, no qual podemos ver que Rac1 e Cdc42 e os mutantes apresentados praticamente não alteram a precipitação de N-WASP, mesmo na presença de GTP ou GDP.

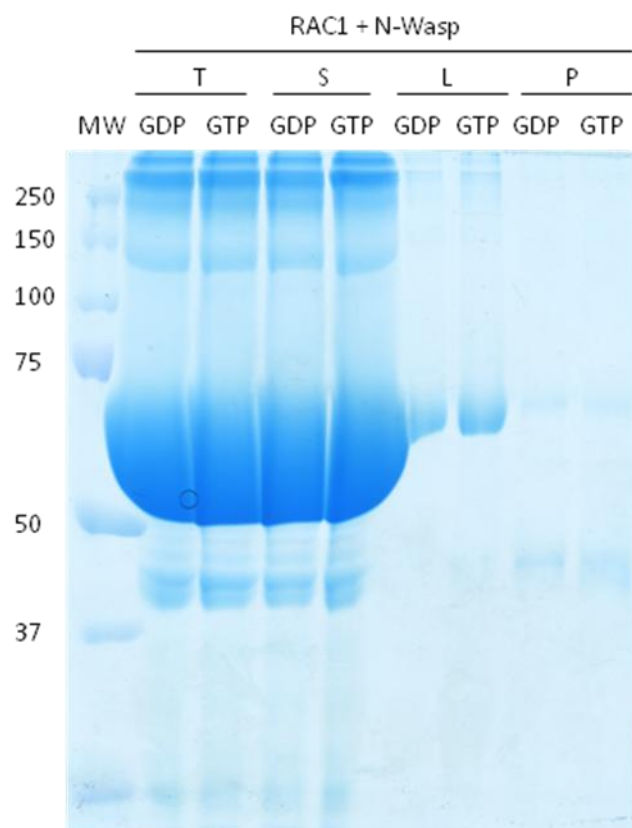


Figura 6. PullDown entre Rac1 e N-WASP, associados com GTP e GDP. Rac1 foi ativado e incubado com Glutathione Sepharose Beads, na presença de GTP ou GDP. Após, 150µL de N-WASP foram adicionados e incubado durante uma h em temperatura ambiente. Uma amostra foi coletada como total(T). Os Beads foram centrifugados a 2000 x g durante três min. Todo o sobrenadante foi coletado(S) e o precipitado foi ressuscitado em Wash Buffer, como descrito em material e métodos, e centrifugado novamente a 2.000 x g por três min. O sobrenadante foi totalmente coletado (L) e o precipitado(P) foi ressuscitado em tampão de solubilização, de maneira a manter o volume pré-centrifugação. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE de 10%. Foi aplicado 10µL de amostra em cada poço.

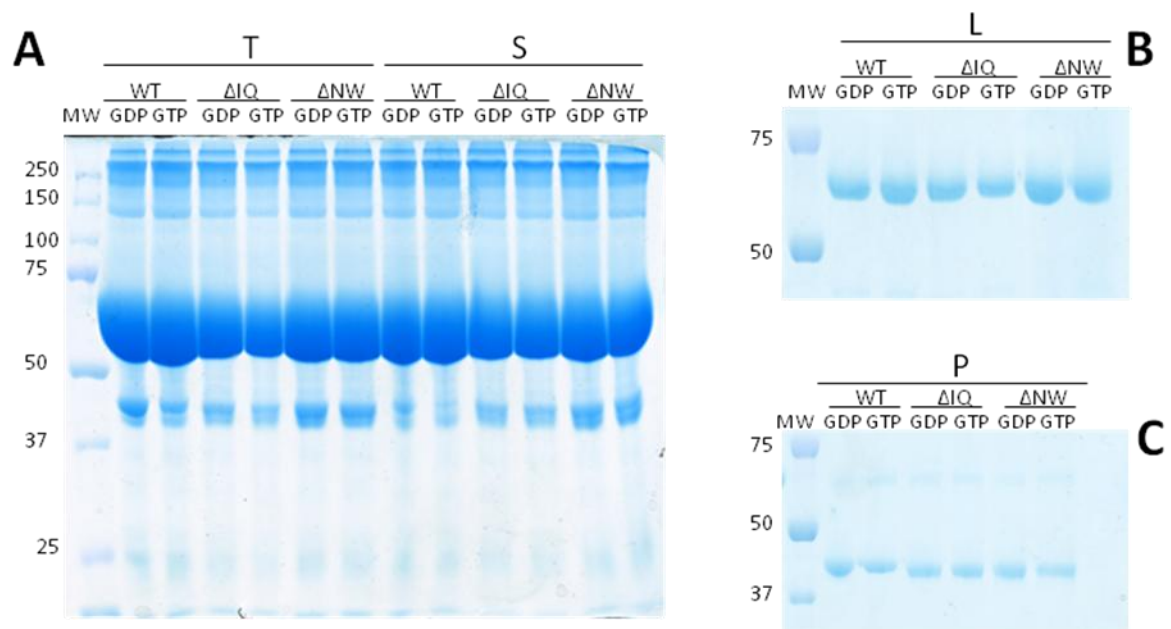


Figura 7. PullDown entre Cdc42, nativas e recombinantes, e N-WASP, associados com GTP ou GDP. Cdc42 nativo (WT), recombinante sem o sítio de ligação para IQGAP1 (Δ IQ) e recombinante sem o sítio de ligação de N-WASP (Δ NW). Todas as variações de Cdc42 foram ativadas e incubadas com Glutathione Sepharose Beads na presença de GTP ou GDP. Após a incubação, 150 μ L de N-WASP foram adicionados e incubados durante uma h em temperatura ambiente. Uma amostra foi coletada como total(T). Os Beads foram centrifugados a 2000 xg durante três minutos. Todo o sobrenadante foi coletado(S), o precipitado foi ressuspensionado em Wash Buffer, como descrito em material e métodos, e centrifugado novamente a 2000 x g por três min. O sobrenadante foi totalmente coletado (L) e o precipitado(P) foi ressuspensionado em tampão de solubilização, de maneira a manter as proporções pre centrifugação. As amostras foram submetidas a um SDS-PAGE de 10%. Foi aplicado 10 μ L de amostra em cada poço.

REFERENCIAS

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A, v.76, n.9, Sep, p.4350-4. 1979.

Fukata, M., S. Kuroda, et al. Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42. J Biol Chem, v.272, n.47, Nov 21, p.29579-83. 1997.

Li, Q. e E. L. Stuenkel. Calcium negatively modulates calmodulin interaction with IQGAP1. Biochem Biophys Res Commun, v.317, n.3, May 7, p.787-95. 2004.

Bashour, A. M., A. T. Fullerton, et al. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. J Cell Biol, v.137, n.7, Jun 30, p.1555-66. 1997.

Le Clainche, C., D. Schlaepfer, et al. IQGAP1 stimulates actin assembly through the N-WASP-Arp2/3 pathway. J Biol Chem, v.282, n.1, Jan 5, p.426-35. 2007.

CONCLUSÃO GERAL

A relação entre IQGAP1 e N-WASP é diretamente proporcional ao aumento de Cdc42 e inversamente proporcional ao aumento de Rac1.

O processo de purificação de IQGAP1 elaborado, foi satisfatório, embora a amostra tenha apresentado alguma contaminação ao final do protocolo estabelecido.